

# **Funktionelle Charakterisierung des Ferredoxin Redoxsystems von *Toxoplasma gondii***

DISSERTATION  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie  
eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Dipl.-Pharm. Nora Frohnecke

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1. Prof. Dr. Richard Lucius  
2. Prof. Dr. Frank Seeber  
3. Prof. Dr. Carsten Lüder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2016

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Frank Seeber, der es mir ermöglichte die Promotion an diesem interessanten Thema durchzuführen. Er hatte stets ein offenes Ohr für mein Forschungsprojekt und war jederzeit zu einer Diskussion bereit, um Anregungen und konstruktive Kritik zu äußern.

Ich danke Herrn Prof. Richard Lucius, Herrn Prof. Frank Seeber sowie Herrn Prof. Lüder, die freundlicherweise die Begutachtung meiner Doktorarbeit übernommen haben.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe FG16 von Dr. Toni Aebischer und vor allem der Gruppe Parasitologie für eine sehr freundliche und kollegiale Zeit am Robert Koch-Institut.

Für anregende Diskussionen, eine angenehme Atmosphäre und ihre Freundschaft während der Promotion und darüberhinaus danke ich Juliane Hahn, Sandra Klein, Anna Kluge, Ina Lucas, Stefanie Marek, Adriana Preiß, Geo Semini und Christoph Ufermann.

Ich danke meinem Vater, der mich zu jeder Zeit und bei jeder Entscheidung bedingungslos unterstützte. Für seinen immerwährenden Zuspruch und seine schier unerschöpfliche Geduld danke ich aus tiefem Herzen meinem lieben Thomas.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung.....</b>	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> : Verteilung, Lebenszyklus und Krankheit.....	5
1.2 Der Apicoplast.....	8
1.2.1 Das Ferredoxin Redoxsystem.....	9
1.2.2 Isoprenoidbiosynthese.....	11
1.2.3 Fettsäure- und Liponsäuresynthese.....	13
1.2.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des <i>Reverse Two-Hybrid Systems</i> .....	16
1.3 Möglichkeiten der genetischen Manipulation durch konditionale Systeme zur funktionellen Analyse von essentiellen Genen in <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	22
<b>2. Material.....</b>	<b>24</b>
2.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	24
2.2.1 Medien.....	24
2.2.2 Puffer und Lösungen.....	25
2.3 Enzyme und Antikörper.....	26
2.3.1 Enzyme.....	26
2.3.2 Antikörper.....	26
2.4 Plasmide und Oligonukleotide.....	26
2.4.1 Plasmide.....	26
2.4.2 Oligonukleotide.....	28
2.5 Kommerzielle Kits.....	29
2.6 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinie und <i>Toxoplasma gondii</i> -Stämme.....	29
2.6.1 Bakterienstämme.....	29
2.6.2 Eukaryotische Zelllinie.....	30
2.6.3 <i>T. gondii</i> -Stämme.....	30
2.7 Software und Datenbanken.....	31
2.7.1 Software.....	31
2.7.2 Datenbanken.....	31
<b>3. Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.1.1 Agarosegelelektrophorese.....	32

3.1.2	DNA-Präparation.....	32
3.1.3	Restriktionsenzymverdau .....	33
3.1.4	PCR – Polymerase Ketten Reaktion .....	33
3.1.5	Klonierung .....	36
3.1.6	Sequenzierung.....	41
3.2	Mikrobiologische Methoden .....	43
3.2.1	Kultivierung und Einfrieren von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	43
3.2.2	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.....	43
3.2.3	F'-Transfer durch Konjugation .....	45
3.2.4	Genomische Integration der Fusionsprotein-Plasmide.....	46
3.2.5	Kinetischer $\beta$ -Galaktosidase Assay .....	46
3.2.6	Optimierung des Selektionsmediums durch Titration von 3-AT und Kanamycin47	
3.3	Zellkulturmethoden .....	49
3.3.1	Kultivierung der eukaryotischen Wirtszelllinie.....	49
3.3.2	Kultivierung von <i>T. gondii</i> Tachyzoiten.....	49
3.3.3	Transfektion von <i>T. gondii</i> .....	50
3.3.4	Immunfluoreszenz Assay.....	52
3.3.5	Plaqueassay.....	53
3.3.6	Replikationsassay .....	55
3.3.7	Motilitätsassay .....	55
3.3.8	Fettsäuren-Extraktion .....	56
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
4.1	Protein-Protein-Interaktionsstudien des Ferredoxin-Redoxsystems .....	58
4.1.1	Erfolgreiche Herstellung der Interaktionsprotein-Plasmide und Integration dieser in den Reporterstamm .....	58
4.1.2	Nachweis der Interaktion von Fd und LipA .....	60
4.1.3	Stringente Screeningbedingungen des Fd-LipA-Reporterstammes durch Optimierung des Selektionsmediums .....	62
4.2	Ein <i>T. gondii</i> Ferredoxin Knockout durch konditionale Exzision des Ferredoxin-Gens65	
4.2.1	Das konditionale Ferredoxin-Knockout Konstrukt ersetzt erfolgreich den endogenen Ferredoxin-Genabschnitt.....	65
4.2.2	Rapamycin-Induktion führt zu keiner Fd Exzision in der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion in <i>T. gondii</i> .....	71
4.2.3	Das Tub8-Promoter Fd Knockout-Konstrukt zeigt nach transienter Transfektion in <i>T. gondii</i> Fd Exzision .....	72
4.2.4	In <i>E. coli</i> ist eine Fd Exzision durch die Cre-Rekombinase beider Fd Knockout-Konstrukte möglich .....	75
4.2.5	Mangelnde Cre-Expression führt nicht zum Ausbleiben der Fd Exzision der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion.....	77
4.3	Konditionale Herabregulation der Ferredoxin Expression und deren Einfluss auf das Überleben von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	78



4.3.1	Erfolgreicher Austausch des endogenen Ferredoxin-Genabschnitts gegen ein induzierbares Ferredoxin-Knockdown Konstrukt .....	78
4.3.2	Tetracyclin bewirkt eine Herabregulation der Fd-Expression in der Fd Knockdown-Mutante .....	82
4.3.3	Die Herabregulation der Ferredoxin-Expression führt zu einer ausgeprägten Reduktion des Parasitenwachstums .....	84
4.3.4	ATc-Induktion verursacht eine verlangsamte Replikation des Fd ikd-Stammes .....	86
4.3.5	Verringerte Motilität als Folge einer beeinträchtigten Isoprenoidsynthese der Fd Knockdown Mutante .....	89
4.3.6	Der Fd ikd-Stamm zeigt nach ATc-Induktion einen Mangel der im Apicolasten synthetisierten C14:0-Fettsäuren .....	91
4.3.7	Keine morphologischen Veränderungen der Ferredoxin Knockdown Mutante in elektronenmikroskopischen Aufnahmen .....	93
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>95</b>
5.1	Protein-Protein-Interaktionsstudien von Fd-LipA und Fd-FNR mit Hilfe des bakteriellen <i>Reverse Two-Hybrid</i> Systems .....	95
5.1.1	Ist die im bakteriellen RTHS ausbleibende Fd-FNR Interaktion den experimentellen Bedingungen geschuldet? .....	97
5.1.2	Direkte PPI von Fd und LipA im RTHS .....	102
5.2	Konditionale Ferredoxin Knockout- und Knockdown-Studien in <i>T. gondii</i> .....	104
5.2.1	Auswirkungen einer Fd Defizienz in photosynthetisch-aktiven Organismen .....	110
5.2.2	Ist in <i>T. gondii</i> eine retrograde Signalkaskade vorhanden, die das Überleben der Parasiten bei einer Fd Defizienz sichert? .....	111
5.3	Ausblick .....	118
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>135</b>
7.1	<i>T. gondii</i> Ferredoxin-Sequenzen .....	135
7.2	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	142
7.3	Oligonukleotide .....	146
7.4	Plasmidkarten .....	149
7.5	Selbstständigkeitserklärung .....	153
7.6	Publikation und Tagungsbeiträge .....	154

## Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
7TetO	Tetracyclin-Operatorsequenz
A	Adenosin
AB	Antibiotikum / Antibiotika
ACP	Acylcarrierprotein
Abb.	Abbildung
Amp / AmpR	Ampicillin / Ampicillin Resistenz durch $\beta$ -Laktamase
ATc	Anhydrotetracyclin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP / ADP	Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	<i>backward</i>
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAM / CAT	Chloramphenicol / CAM Resistenz durch CAM Acetyltransferase
CDP-ME(P)	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol(-2-phosphat)
Chr	Chromosom
CLEM	<i>Correlative Light and Electron Microscopy</i>
CoA	Coenzym A
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
Cre	Cre-Rekombinase
CRIM	<i>Conditional replication, intergration, and modular</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTP / CMP	Cytidintriphosphat / Cytidinmonophosphat
Cy5	Indodicarbocyanin
Cys	Cystein
d	Tag(e) (engl. <i>day</i> )
D	Deutschland
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast (engl. <i>differential interference contrast</i> )
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOXP	1-Desoxy-D-xylulose 5-phosphat
DOXPRI / IspC	DOXP-Reduktoisomerase
DOXPS	DOXP-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat

engl.	Englisch
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäuresynthese (engl. <i>fatty acid synthesis</i> )
Fd	Ferredoxin
FKBP	<i>FK506- and rapamycin-binding protein</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding domain</i>
FS	Fettsäure(n)
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridin
FW	<i>Forward</i>
g	Erdbeschleunigung (in Verbindung mit Zentrifugationen)
g	Gramm
G	Gauge oder Guanosin
G3P	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAP	<i>Gliding-associated protein</i>
GcpE / IspG	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Gent	Gentamicin
GOI	Gen von Interesse (engl. <i>gene of interest</i> )
GR	Glutathion Reduktase
GSH	Glutathion
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten (engl. <i>human foreskin fibroblasts</i> )
<i>HIS3</i>	Imidazol-Glycerol-Phosphatdehydratase
HMBPP	(E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat
HO	Häm-Oxygenase(n)
hpi	<i>Hours post infection</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HX / HXGPRT	Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFA	Immunfluoreszenz Assay
Ig	Immunglobulin
ikd	induzierbarer Knockdown
IntC bzw. IntN	C-terminales bzw. N-terminales Intein
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
Kan / KanR	Kanamycin / Kan Resistenz durch Aminoglycosid 3'-Phosphotransferase
kb	Kilo-Basenpaare (engl. <i>kilo base pairs</i> )
kompl.	Komplementiert
l	Liter
LA	Liponsäure (engl. <i>lipoic acid</i> )
LB	Luria-Bertani
LipA	Liponsäuresynthase
LipB	Lipoyl (Octanoyl)-Transferase
LytB / IspH	HMBPP-Reduktase
m	Milli- oder Meter

M	Molar [mol/l]
μ	Mikro-
mAb	Monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal antibody</i> )
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MEcPP	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat
MEP	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
min	Minuten
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i> )
mol	Stoffmenge
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPA	Mycophenolsäure (engl. <i>mycophenolic acid</i> )
mRR	<i>Murine ribonucleotide reductase</i>
MU	Miller Unit
n	Nano-
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
OD	optische Dichte
ON	Oligonukleotid(e)
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ori	<i>Origin of replication</i>
P	Promoter
pAb	Polyklonaler Antikörper (engl. <i>polyclonal antibody</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFA	Paraformaldehyd
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PhoR	<i>Phosphate regulon sensor protein</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
pt	Pflanzen-Typ (engl. <i>plant-type</i> )
Pyr	Pyruvat
RE	Restriktionsenzym(e)
RKI	Robert Koch-Institut
(r)RNA	(Ribosomale) Ribonukleinsäure (engl. <i>(ribosomal) ribonucleic acid</i> )
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTHS	<i>Reverse two-hybrid system</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SAG1	<i>Surface antigen 1</i>
SAM	<i>S-Adenosylmethionin</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sgRNA	<i>small guide RNA</i>
SICLOPPS	<i>Split-intein mediated circular ligation of peptides and proteins</i>
SLIC	<i>Sequence and Ligation Independent Cloning</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>

---

SOD	Superoxid-Dismutase
Spec	Spectinomycin
T	Thymidin
T <sub>A</sub>	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
t <sub>E</sub>	Zeit bei der Elongation
Temp.	Temperatur
Tet	Tetracyclin
<i>Tg / T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tim	Timentin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U	Unit(s)
ün	Über Nacht
UPRT	Uracil-Phosphoribosyltransferase
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volt
v/v bzw. w/v	Volumen bzw. Gewicht pro Volumen (engl. <i>volume/weight per volume</i> )
WHO	<i>World Health Organization</i>
XA	Xanthin
YchB / IspE	CDP-ME-Kinase
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YgbB / IspF	MEcPP-Synthase
YgbP / IspD	MEP-Cytidylyltransferase

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ultrastruktur von <i>T. gondii</i> .....	5
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> .....	6
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems an der Isoprenoid- und Liponsäure- bzw. Fettsäuresynthese im Apicoplast .....	9
Abb. 4: Reaktionsschritte der Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP über den DOXP-Syntheseweg ...	13
Abb. 5: Fettsäureaufnahme und -syntheseweg in <i>T. gondii</i> .....	14
Abb. 6: Schema der Liponsäuresynthese unter voraussichtlicher Beteiligung des Ferredoxin- Redoxsystems .....	15
Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des <i>Reverse Two-Hybrid</i> Systems .....	18
Abb. 8: Transkriptionskontrolle durch eine Tetracyclin-induzierbare Promoterregion .....	20
Abb. 9: Funktionsweise DiCre System .....	21
Abb. 10: Schema der Herstellung von Gradientenplatten und der resultierende Gradient .....	47
Abb. 11: Genomische Integration der Protein-Protein-Interaktions-Plasmide .....	59
Abb. 12: Fd und LipA interagieren im <i>Reverse Two-Hybrid System</i> .....	61
Abb. 13: Optimierung der Medienzusammensetzung durch Titration von 3-AT und Kanamycin .....	63
Abb. 14: Gezielter Genaustausch von endogenem Fd zu loxP-flankiertem Fd (endogener Promoter) ..	66
Abb. 15: Unvollständiger Genaustausch von endogenem Fd zu loxP-flankiertem Fd (Tub8-Promoter) .....	68
Abb. 16: Nachweis des Myc-markierten Fd in der Fd DiCre Knockout-Mutante (DiCre-Fd) .....	69
Abb. 17: Keine Fd Exzision in der Fd Knockout-Mutante nach Rapamycin-Behandlung nachweisbar .....	71
Abb. 18: Rapamycin-Behandlung führt nach transienter Transfektion in der Fd Knockout-Mutante mit Tub8-Promoter zur Fd Exzision .....	73
Abb. 19: Fd Exzision durch die Cre-Rekombinase in <i>E. coli</i> .....	76
Abb. 20: Eine zusätzlich transient transfizierte Cre-Rekombinase führt nicht zur Fd Exzision in der Fd Knockout-Mutante DiCre-Fd .....	77
Abb. 21: Austausch des endogenen Ferredoxin-Genabschnittes gegen ein Tetracyclin-induzierbares Ferredoxin-Knockdown Konstrukt in <i>T. gondii</i> .....	79
Abb. 22: Detektion des Myc-markierten Fd in der Fd Knockdown-Mutante .....	81
Abb. 23: Regulation der Tetracyclin-induzierbaren Fd Knockdown-Mutante .....	83
Abb. 24: Ausgeprägte Wachstumsinhibition des Fd ikd-Stammes nach ATc-Induktion im Plaqueassay .....	85
Abb. 25: Lytischer Zyklus und <i>delayed death</i> -Phänotyp von <i>T. gondii</i> .....	86
Abb. 26: Der Fd ikd-Stamm zeigt ab dem dritten Zyklus unter ATc-Behandlung eine deutlich verringerte Replikation .....	88
Abb. 27: Ein Fd Knockdown führt zu einer verringerten Motilität .....	90

---

Abb. 28: Reduktion der im Apicoplasten synthetisierten C14:0-Fettsäure des Fd ikd-Stammes nach ATc-Induktion .....	92
Abb. 29: Keine morphologischen Veränderungen der Fd Knockdown-Mutante in Korrelativen Licht- und Transmissions-Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen eines Einzelplaques ....	94
Abb. 30: FNR Proteinsequenz-Vergleich von <i>root-type Zea mays</i> und <i>T. gondii</i> .....	101
Abb. 31: Schematische Darstellung der SICLOPPS Funktionsweise .....	103
Abb. 32: Ferredoxin Sequenz von <i>T. gondii</i> eines GT1-Stammes (Typ I-Stamm; Chromosom X).....	141
Abb. 33: Ferredoxin cDNA Sequenz von <i>T. gondii</i> .....	141

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Medien und Agar .....	24
Tab. 2 Puffer und Lösungen .....	25
Tab. 3 Antibiotikallösungen und deren eingesetzte Konzentration .....	25
Tab. 4 Antikörper und eingesetzte Verdünnungen .....	26
Tab. 5 Plasmide (Plasmidkarten fett-markierter Plasmide siehe 7.4) .....	26
Tab. 6 Kommerzielle Kits .....	29
Tab. 7 Bakterienstämme .....	29
Tab. 8 <i>T. gondii</i> Stämme .....	30
Tab. 9 Software .....	31
Tab. 10 Datenbanken .....	31
Tab. 11 PCR-Programm bei Verwendung der <i>Phusion</i> ®-Polymerase .....	34
Tab. 12 PCR-Programm bei Verwendung der <i>Mango Taq</i> <sup>TM</sup> Polymerase .....	34
Tab. 13 Auflistung der verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration eines Konstruktes in <i>T. gondii</i> sowie die dabei verwendete T <sub>A</sub> , t <sub>E</sub> und Zyklenanzahl. ....	35
Tab. 14 Oligonukleotid-Kombinationen zur Identifizierung erfolgreich klonierter Plasmide in der Kolonie-PCR sowie die dabei verwendete T <sub>A</sub> .....	36
Tab. 15 Übersicht sämtlicher generierter Plasmide unter Angabe der Klonierungsstrategie (Plasmidkarten fett-markierter Plasmide siehe 7.4) .....	37
Tab. 16 Ansatz der Extensions-PCR (CPEC) .....	40
Tab. 17 Parameter der Extensions-PCR (CPEC) .....	40
Tab. 18 T4-DNA Polymerase Behandlung der einzelnen Fragmente (SLIC) .....	41
Tab. 19 RecA Ansatz der T4-DNA-Polymerase behandelten Fragmente (SLIC) .....	41
Tab. 20 Programm der Sequenzierungs-PCR .....	41
Tab. 21 Oligonukleotid-Kombinationen zur Identifizierung erfolgreich klonierter Plasmide in der Sequenzierungs-PCR sowie die dabei verwendete T <sub>A</sub> .....	42
Tab. 22 Übersicht über die Antibiotika sowie 3-AT bzw. Kan-Konzentrationen in MOPS- Agarplatten .....	48
Tab. 23 Geräteliste .....	142
Tab. 24 Chemikalienliste .....	143
Tab. 25 Verbrauchsmaterialien .....	145
Tab. 26 Oligonukleotide eingesetzt zur Klonierung (1-37) und zur analytischen PCR bzw. Sequenzierung (34-80) .....	146



## Zusammenfassung

Toxoplasmose ist weltweit eine der am häufigsten auftretenden parasitären Zoonosen mit einer geschätzten Infektionsrate von über 30 %. Je nach Region und Alter sind in Deutschland bis zu 60 % der Bevölkerung mit *Toxoplasma gondii* infiziert. *T. gondii* gehört zum Phylum der Apicomplexa und besitzt als Merkmal dieses Stammes ein Plastid-ähnliches Organell, den Apicoplasten. In diesem befindet sich das einzig bekannte Redoxsystem, welches aus der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) und Ferredoxin (Fd) besteht. Fd als Elektronendonator liefert Elektronen an verschiedene essentielle Stoffwechselwege, wie an die letzten beiden Enzyme der Isoprenoidvorstufensynthese. Voraussichtlich erhält zudem die Liponsäuresynthese (LipA) Elektronen von Fd, welche Bestandteil der Liponsäuresynthese ist - ein anderer wichtiger, im Apicoplasten lokalisierter Stoffwechselweg. Bei Liponsäure handelt es sich zudem um einen essentiellen Kofaktor der Fettsäuresynthese. Um die bei einem Elektronentransfer benötigte direkte Protein-Protein-Interaktion von TgFd auf TgLipA eingehend zu analysieren, wurde ein bakterielles *Reverse Two-Hybrid* System (RTHS) verwendet. Die Interaktion von TgFd und TgLipA konnte gezeigt werden. Zudem wurde die vielfach in der Literatur beschriebene Interaktion von TgFd und TgFNR untersucht, die jedoch unter den gewählten Bedingungen des hier verwendeten RTHS nicht nachgewiesen werden konnte.

Da angenommen wird, dass Fd eine zentrale Rolle in verschiedenen Stoffwechselwegen übernimmt, ist für einen Fd Knockout ein komplexer biochemischer Phänotyp zu erwarten, der möglicherweise zum Absterben der Parasiten führt. Zur Untersuchung dessen wurden zwei komplementäre Wege verfolgt. Eine der Strategien basierte auf dem grundsätzlichen Nachweis, dass Fd unerlässlich für das Überleben von *T. gondii* ist. Dazu wurde das DiCre System verwendet, bei welchem ein definierter genetischer Fd Knockout hergestellt wird. Entsprechende Parasiten wurden generiert, es konnte jedoch kein genetischer Fd Knockout zweifelsfrei hergestellt werden.

Bei der zweiten Strategie kam ein konditionales Knockdown System zur Anwendung, bei welchem die Expression des Fd-Gens nach Induktion herabreguliert wird. Mit Hilfe von Plaqueassays konnte eine dramatische Wachstumsinhibition der Fd Knockdown Parasiten festgestellt werden, was auf essentielle Funktionen von Fd hinweist. Ultrastrukturelle Analysen mittels Elektronen-mikroskopischer Aufnahmen einzelner Plaques ergaben keine morphologischen Veränderungen der Fd Knockdown Parasiten. So scheint die beobachtete Wachstumsinhibition mit einer biochemischen anstatt einer strukturellen Veränderung im Zusammenhang zu stehen. Mit Hilfe von <sup>13</sup>C-Glukose wurden daher verschiedene

Stoffwechselprodukte metabolisch markiert und schließlich der Gehalt an Fettsäuren nach Extraktion ermittelt. Es ergab sich eine 30%ige Reduktion der im Apicoplasten synthetisierten Fettsäuren der Fd Knockdown-Mutante im Vergleich zum parental Stamm. Zur Untersuchung weiterer biochemischer Auswirkungen einer Fd Defizienz wurde die Isoprenoidsynthese des Apicoplasten analysiert. Eine Beeinträchtigung dieser kann indirekt die Motilität der Parasiten einschränken. Die Untersuchung der verblindeten Proben in einem Motilitätsassay ergaben für die Fd Knockdown Parasiten im Vergleich zum komplementierten Stamm eine um 20 % signifikante Abnahme der Motilität.

Die Fd Defizienz hat insgesamt weitreichende Auswirkungen auf *T. gondii*: Die Fettsäuresynthese der im Apicoplasten synthetisierten Fettsäuren ist reduziert sowie die Motilität durch eine beeinträchtigte Isoprenoidsynthese verringert, wodurch insgesamt drastische Auswirkungen auf das Parasitenwachstum gezeigt werden konnten. Beide Stoffwechsel sind vom Elektronendonator Ferredoxin abhängig und durch die Fd Herabregulation betroffen. Die Ergebnisse unterstreichen die essentielle Rolle des Ferredoxin-Redoxsystems von *T. gondii*.

## Abstract

Toxoplasmosis is one of the most common parasitic zoonoses world-wide, around 30 % of human beings are infected. Depending on region and age up to 60 % of the German population is infected with *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* belongs to the phylum Apicomplexa and contains a unique intracellular organelle derived from plastids, called apicoplast. The only known redox system in the apicoplast consists of the ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase (FNR) and its redox partner, ferredoxin (Fd). The latter donates electrons to different essential metabolic pathways in the apicoplast like the last two enzymes of the isoprenoid precursor biosynthesis. Another important apicoplast-localized pathway is the lipoic acid synthesis, whereby lipoate synthase (LipA) presumably receives electrons from Fd. Lipoic acid is an essential cofactor for the fatty acid biosynthesis. To dissect the protein protein interaction for the electron transfer between *TgFd* and *TgLipA* a bacterial reverse two-hybrid system (RTHS) was used. The physical interaction of both proteins *TgFd* and *TgLipA* could be shown. Additionally the already known interaction of *TgFd* and *TgFNR* was studied. However, this physical interaction of *TgFd* and *TgFNR* was not detected under chosen conditions of the used RTHS. Fd is supposed to play an important role in diverse metabolic pathways, hence a knock-out of the Fd gene is expected to generate a complex biochemical phenotype and be lethal to the parasite. Therefore two complementary approaches were used to analyze the role of *TgFd* in this context. The first strategy shall verify the essentiality of *TgFd* for the survival of *T. gondii*. It is based on the DiCre system whereby a defined genetic knock-out of *TgFd* is produced. Respectives parasites have been generated, but at the end no genetic Fd knock-out could be produced.

In the second approach a conditional knock-down was generated, where the expression of the *TgFd* gene is repressed after induction. A dramatic growth inhibition in *TgFd* knock-down parasites in plaque assays implies that *TgFd* has essential functions. Ultrastructural analysis with electron microscopy of individual plaques did not reveal any morphological changes of the Fd knock-down clone. The results of the Fd knock-down provide evidence that the observed growth phenotype is connected to biochemical rather than cellular or structural defects. Therefore several metabolites were labelled with the <sup>13</sup>C-glucose and after extraction the amount of fatty acids was analyzed. Compared to wild-type parasites the *TgFd* knock-down clone showed a substantial decrease by 30 % fatty acids, which are generated during *de novo* fatty acid synthesis in the apicoplast. The isoprenoid synthesis of the apicoplast was analyzed in order to show further biochemical effects by Fd deficiency. Alterations of the isoprenoid synthesis can indirectly affect parasite motility. Analyzing

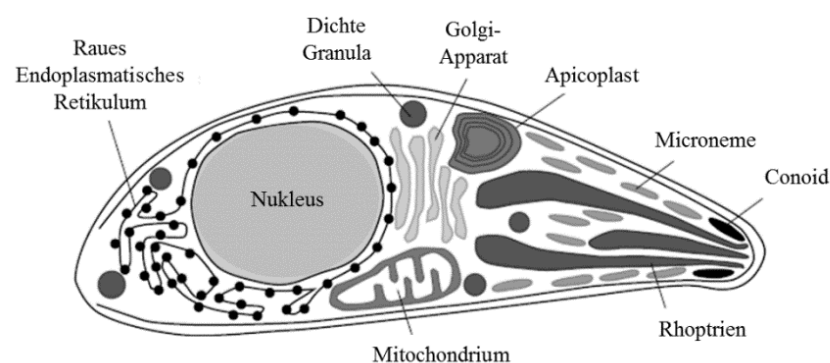
blinded samples from motility assays revealed a statistically significant lower (20 %) motility of the knock-down clone compared to the complemented strain.

Taken together, the Fd deficiency has wide-ranging effects on *T. gondii*: The fatty acid synthesis of the apicoplast-synthesized fatty acids is reduced as well as the motility is decreased due to an affected isoprenoid synthesis. In total this leads to a dramatic inhibition of parasite growth. Both metabolic pathways depend upon the electron carrier Fd and thus are affected by Fd deficiency. The results underline the essential role of the ferredoxin redoxsystem of *T. gondii*.

# 1. Einleitung

## 1.1 *Toxoplasma gondii*: Verteilung, Lebenszyklus und Krankheit

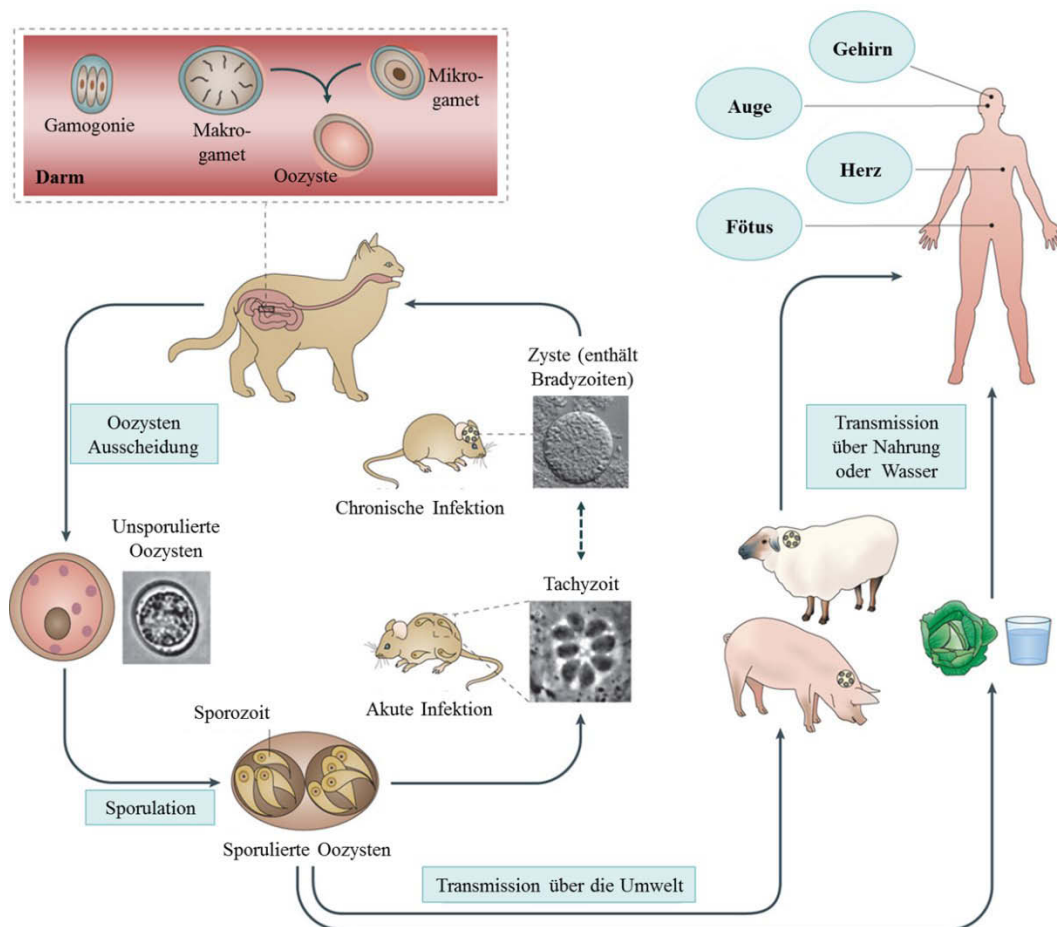
Toxoplasmose ist weltweit eine der am häufigsten auftretenden parasitären Zoonosen mit einer geschätzten Infektionsrate von über 30 %. In Deutschland sind je nach Region und Alter bis zu 60 % der Bevölkerung mit dem obligat, intrazellulären Protozoon, *Toxoplasma gondii*, infiziert (Gross 2004). *T. gondii* wie auch *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica), *Cryptosporidium parvum* (Erreger der Cryptosporidiose bei Kälbern und Menschen) sowie Parasiten der Gattung *Eimeria* (Erreger der Kokzidiose von Geflügel und Nutztieren) sind dem Stamm der Apicomplexa zuzuordnen. Neben dem rauen endoplasmatischen Retikulum, einem Nukleus sowie Mitochondrium besitzen Apicomplexa den apikalen Komplex als gemeinsames Merkmal (siehe Abb. 1). Dieser befindet sich vornehmlich im apikalen Teil der Zelle und besteht aus unterschiedlichen Organellen, wie dem Polringkomplex, dem Conoid, den Rhoptrien, den Micronemen und den dichten Granula (Ferguson und Dubremetz 2014). All diese Zellbestandteile sind bei der Invasion der Parasiten sowie der Ausbildung der parasitophoren Vakuole beteiligt (Entzeroth *et al.* 1998). Ebenfalls allen Apicomplexa gemein ist ein nicht mehr photosynthetisch-aktives Plastid, der Apicoplast, welches von vier Membranen umgeben ist und ein Genom mit einer Größe von 35 kb enthält (Kohler *et al.* 1997, Wilson *et al.* 1994). Eine nähere Beschreibung dieses Plastids und der hier lokalisierten Stoffwechselwege folgt in Kapitel 1.2.



**Abb. 1: Ultrastruktur von *T. gondii***

Neben dem rauen endoplasmatischen Retikulum, einem Nukleus sowie Mitochondrium haben Apicomplexa als charakteristisches Merkmal einen Apikalkomplex aus Conoid, Rhoptrien, Micronemen und dichten Granula. Zudem beherbergen Apicomplexa ein rudimentäres Plastid-Organell, den Apicoplasten. (Abb. verändert übernommen von Ajioka *et al.* 2001)

Die geschlechtliche Vermehrung in Katzen und katzenartigen Tieren (*Felidae*) als Endwirt stellt eine der Vermehrungsformen von *T. gondii* dar (siehe Abb. 2). Hat sich eine Katze über die Aufnahme eines ebenfalls infizierten Zwischenwirts erstmals infiziert, findet im Darm die sexuelle Phase, die Gamogonie, statt. Die dabei aus den freigesetzten Bradyzoiten gebildeten Merozoiten differenzieren sich zu Mikro- bzw. Makrogameten, die sich nach Fusion zu Oozysten entwickeln. Eine infizierte Katze kann bis zu  $10^6$  unsporulierte Oozysten pro Tag ausscheiden. Unter günstigen Umweltfaktoren (Feuchtigkeit, Wärme, Luftzirkulation) beginnt die Sporogonie. Während der Sporulation entstehen innerhalb der Oozysten zwei Sporocysten mit jeweils vier Sporozoiten. Die sporulierten Oozysten sind gegenüber verschiedenen



**Abb. 2: Lebenszyklus von *T. gondii***

Katzen stellen den Endwirt von *T. gondii* dar, in dem die sexuelle Vermehrung im Darm (Gamogonie) stattfindet. Dabei werden Mikro- und Makrogameten gebildet, aus denen sich wiederum nach Fusion eine unsporulierte Oozyste entwickelt. Nach dem Ausscheiden dieser entstehen während der Sporulation sporulierte Oozysten, die gegenüber äußeren Umwelteinflüssen sehr widerstandsfähig sind und über die Nahrung aufgenommen werden können (Verzehr von ungenügend gegartem Fleisch, kontaminiertes Wasser oder Gemüse). Zunächst vermehren sich während der akuten Infektion die Tachyzoiten in nahezu allen kernhaltigen Zellen der Zwischenwirte. Nach einsetzender Immunantwort findet eine Umwandlung in Bradyzoiten statt, die im Gehirn oder Gewebe während der chronischen Infektion in Zysten überdauern. Erfolgt eine Erstinfektion während der Schwangerschaft ist eine Transmission auf den Fötus möglich. (Abb. verändert entnommen von Hunter und Sibley 2012)

Umwelteinflüssen sehr widerstandsfähig und nach der Bildung bis zu fünf Jahre infektiös (Lucius und Loos-Frank 2008). Zwischenwirte können sich über die in die Umwelt abgegebenen Oozysten infizieren, so z.B. der Mensch durch die Aufnahme von ungenügend gegartem oder rohem infiziertem Fleisch oder auch durch Oozysten-kontaminierte Nahrungsmittel bzw. Trinkwasser. Infolge einer akuten Infektion klagt lediglich eine geringe Anzahl von Patienten über leichte, grippeähnliche Symptome, wohingegen der Großteil der Immunkompetenten die Infektion nicht wahrnimmt (Gross *et al.* 2001). Nach der erstmaligen Infektion vermehren sich die intrazellulären Tachyzoiten ungeschlechtlich durch Schizogenie über Endodyogenie im Wirt und differenzieren sich zu Bradyzoiten, in sogenannten Zysten, die u.a. in Gehirn- und Muskelzellen überdauern (Dubey *et al.* 1998). Eine Umwandlung der Tachyzoiten zu Bradyzoiten findet aufgrund der einsetzenden Immunantwort des Wirtes statt (Lucius und Loos-Frank 2008). Die lebenslange Manifestation der Bradyzoiten bleibt für gewöhnlich ohne klinischen Befund, kann sich jedoch als okuläre Toxoplasmose (Retinochorioiditis), als die am häufigsten auftretende Spätfolge, äußern (Talabani *et al.* 2010). Tritt eine Immunsuppression infolge einer HIV-Infektion oder Transplantation ein, kann eine Reaktivierung der persistierenden Erreger stattfinden, infolgedessen es zu Bewusstseinsveränderungen oder motorischen Ausfallerscheinungen bis hin zum Tod kommen kann (Gross *et al.* 1996). Neben der postnatal erworbenen Toxoplasmose stellt die primäre Toxoplasmen-Infektion des Neugeborenen während der Schwangerschaft, die konnatale Toxoplasmose, eine weitere Gefahr dar. Das Auftreten klinischer Symptome bei der Geburt hängen dabei vom Zeitpunkt der Infektion in der Schwangerschaft ab, wobei es bei früher Transmission (1. Trimenon) des Parasiten auf den Fötus zu Missbildungen (Hydrozephalus, Retinochorioiditis, zerebrale Kalzifikationen) und sogar Aborten kommen kann und bei später Transmission (3. Trimenon) vorerst ohne Auswirkungen bleiben kann. Bei klinisch uncharakteristischem Verlauf ist eine Spätmanifestation der konnatalen Toxoplasmose jedoch noch nach 20 Jahren in Form von Strabismus, Retinochorioiditis, Taubheit, psychomotorischer Retardierung oder Epilepsie möglich (Gross *et al.* 2001). Den Therapiestandard der Toxoplasmose bei akuter Infektion stellen Pyrimethamin in Kombination mit Sulfadiazin sowie die Gabe von Folsäure (aktive Form der Folsäure) dar. In der Schwangerschaft wird bis zur 16. Schwangerschaftswoche Spiramycin als Therapeutikum eingesetzt (Robert Koch-Institut 2007). Hervorzuheben ist, dass derzeit keine medikamentöse Behandlung der chronischen Infektion existiert, jedoch sind verschiedene Ansatzpunkte einer Therapie insbesondere im Apicoplasten vorhanden (Wiesner und Seeber 2005).

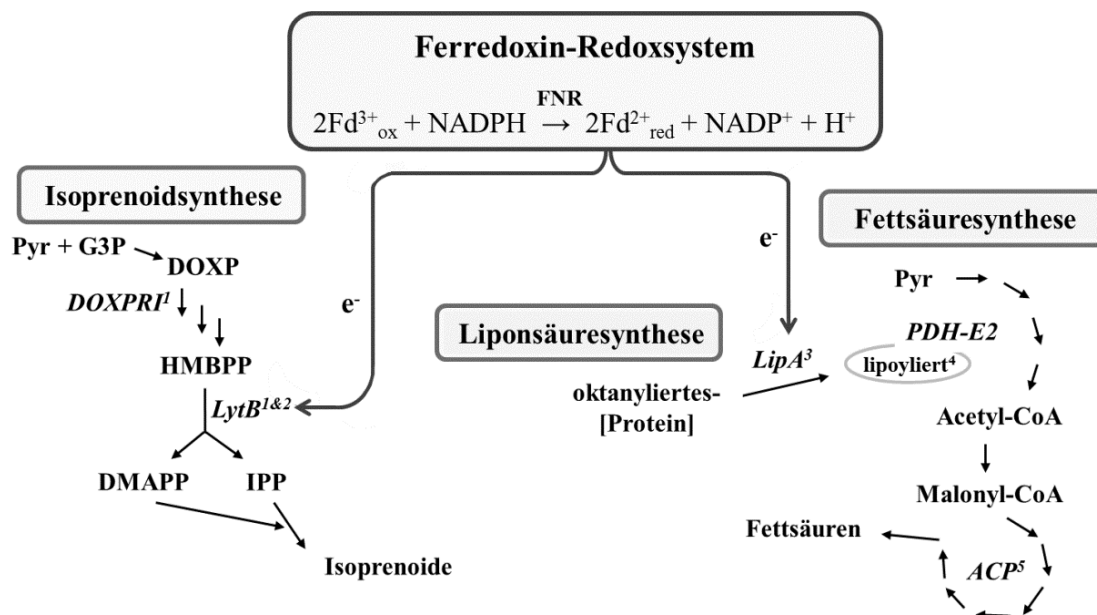
## 1.2 Der Apicoplast

Der Apicoplast enthält ein zirkuläres Genom mit einer Größe von 35 kb, welches hohe Übereinstimmungen zu Plastid-Genomen von Pflanzen und Algen besitzt, wobei es durch das Fehlen von Genen der Photosynthese-Maschinerie eine vergleichsweise reduzierte Größe aufweist (Wilson und Williamson 1997, McFadden 2011). Diese Ähnlichkeiten zu Chloroplasten wurden durch die Entdeckung zweier Kopien der kleinen und großen Untereinheit der rRNA und einer eubakteriellen Untereinheit einer RNA Polymerase auf der 35 kb DNA des Apicoplasten deutlich (Gardner *et al.* 1988, Gardner *et al.* 1991a, Gardner *et al.* 1991b, Gardner *et al.* 1993). Die im Genom des Apicoplasten hinterlegten Gene dienen vornehmlich der Selbstreplikation des Plastids, jedoch werden vom Nukleus zahlreiche Proteine kodiert, die mit Hilfe einer spezifischen N-terminalen, zweigeteilten Sequenz zum Apicoplast geleitet werden. Die Sequenz besteht aus einer Signalsequenz zum Transport über das endoplasmatische Retikulum gefolgt von einem Peptid zum Übertritt in das von vier Membranen umgebende Plastid (Ajioka *et al.* 2001). Vermutlich sind die vier Membranen des Apicoplasten aus einer doppelten Phagocytose hervorgegangen. Demnach entstand eine Rotalge durch die Aufnahme einer Prokaryotenzelle von einer Zelle ohne Endosymbionten während der primären Endosymbiose. Die Rotalge wiederum wurde in einer sekundären Endosymbiose durch ein Protozoon aufgenommen (Lucius und Loos-Frank 2008). Neben dem Genom sowie dem Stroma sind die Membranen jeweils erhalten geblieben, so dass der Apicoplast mit vier umgebenden Membranen resultierte (Lucius und Loos-Frank 2008). Im Apicoplasten sind verschiedene Stoffwechselwege lokalisiert, wie die Isoprenoidsynthese des Mevalonat Typs, die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese, die Häm-Synthese sowie die Liponsäure- und bakterielle Fettsäuresynthese (FAS II). In diesen unterschiedlichen Stoffwechselwegen wird die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten benötigt, die voraussichtlich aus dem einzig bekannten Redoxsystem dieses Plastids, dem Ferredoxin-Redoxsystem stammen (Vollmer *et al.* 2001). Die genannten Stoffwechselwege des Apicoplasten stellen vielversprechende Wirkstoff-Targets dar, da sie zum einen essentiell für das Überleben von *T. gondii* sind (Mazumdar *et al.* 2006, Nair *et al.* 2011) und zum anderen durch die Abstammung des Apicoplasten von einer Rotalge und somit ursprünglich von einem Cyanobakterium nicht im Menschen vorhanden sind (Seeber und Soldati 2007).



### 1.2.1 Das Ferredoxin Redoxsystem

Das im Apicoplasten von *T. gondii* vorhandene Ferredoxin-Redoxsystem vom Pflanzen-Typ (pt) besteht aus dem Eisen-Schwefel ([Fe-S])-Protein Ferredoxin (Fd) und der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR, EC 1.18.1.2). Bei Fd handelt es sich um ein kleines, lösliches und sehr saures Protein, welches ein Eisen-Schwefel-Cluster ([2Fe-2S]) enthält und an Ein-Elektronen-Transfer-Reaktionen beteiligt ist (Zanetti *et al.* 2006). Ein Überblick der insbesondere in dieser Arbeit betroffenen Stoffwechselwege ist in Abb. 3 dargestellt. Die Koordinierung der [2Fe-2S]-Cluster erfolgt über Cysteine, die mit den sich dazwischen befindlichen Aminosäuren der unterschiedlichen Fd-Familien ein charakteristisches Motiv bilden: Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>29</sub>-Cys (wobei X für eine beliebige Aminosäure steht). Je zwei Schwefelatome der Cystein-Seitenketten bilden dabei eine Bindung zu einem der Eisenatome (Matsubara *et al.* 1976). FNR gehört zu den Flavoenzymen, welche nicht-kovalent gebundenes FAD als prosthetische Gruppe enthalten. Die Struktur dieses Enzyms ist in zwei Domänen organisiert, wobei sich das aktive Zentrum zwischen der N-terminalen FAD- und C-terminalen NADP-bindenden Domäne befindet (Aliverti *et al.* 2008). FNR katalysieren im



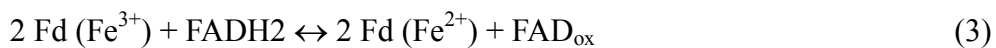
**Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems an der Isoprenoid- und Liponsäure- bzw. Fettsäuresynthese im Apicoplast**

Das Ferredoxin-Redoxsystem liefert Elektronen an LytB (<sup>2</sup>*P. falciparum*, Rohrich *et al.* 2005) der Isoprenoidsynthese und voraussichtlich an LipA der Liponsäuresynthese via direkter PPI (<sup>3</sup>Frohnecke *et al.* 2015). Die Lipoylierung der PDH-E2 ist für die enzymatische Aktivität des Proteins unerlässlich (<sup>4</sup>Crawford *et al.* 2006). Die Enzyme DOXPRI, LytB (<sup>1</sup>Nair *et al.* 2011) und ACP (<sup>5</sup>Mazumdar *et al.* 2006) haben sich in *T. gondii* bereits als essentiell für das Überleben der Parasiten herausgestellt. Einzelheiten zum Ferredoxin-Redoxsystem bzw. zur Isoprenoid-, Liponsäure- und Fettsäuresynthese sowie Abkürzungen siehe 1.2.

Allgemeinen Elektronenübertragungs-Reaktionen zwischen Ferredoxin und NADP(H). Gleichung 1 beschreibt die Reaktion, wie sie sowohl in photosynthetisch-aktiven als auch in nicht photosynthetisch-aktiven Plastiden stattfindet. In photosynthetisch-aktiven Plastiden werden dabei die aus dem Photosystem I stammenden Elektronen über Fd auf NADP<sup>+</sup> übertragen, so dass NADPH entsteht, welches wiederum zur CO<sub>2</sub>-Fixierung im Calvin Zyklus verwendet wird (Gleichung 1, Zanetti und Merati 1987); das Gleichgewicht der Reaktion liegt dann auf der linken Seite. Der Apicoplast ist, wie die Plastide, die in Wurzeln vorkommen, nicht photosynthetisch-aktiv; dort werden die Elektronen in die entgegengesetzte Richtung transferiert, so dass durch die Elektronen von NADPH reduziertes Fd entsteht und das Gleichgewicht der Reaktion dementsprechend auf der rechten Seite liegt (Gleichung 1, Aliverti *et al.* 2001).



FNR ist in der Lage Elektronen zwischen mono- und bi-elektronischen Substraten auszutauschen. Diese Fähigkeit ist aufgrund der prosthetischen Gruppe FAD möglich, die in drei möglichen Redoxzuständen vorliegen kann. Die dafür verantwortliche Struktur des FADs, der Isoalloxazinring, kann oxidiert als Chinon, durch ein Elektron reduziert als intermediäres Semichinon oder vollständig reduziert als Hydrochinon vorliegen (Dudley *et al.* 1964). Demnach verläuft der FNR-vermittelte Elektronentransfer zu Fd in zwei Schritten: Zunächst erfolgt die Oxidation von NADPH und damit einhergehend der gleichzeitige Protonentransfer auf FAD (2 e<sup>-</sup>, Gleichung 2). Im Anschluss schließt sich die Reduktion von zwei Ferredoxinen (je 1 e<sup>-</sup>) und die Regeneration von FAD über die zwei zuvor beschriebenen Redoxzustände an (Gleichung 3, Ceccarelli *et al.* 2004). Das so erhaltene reduzierte Fd kann im Apicoplasten als Elektronendonator für andere Stoffwechselwege, wie der Isoprenoid- und Liponsäure- sowie Fettsäurensynthese dienen (siehe 1.2.2 bzw. 1.2.3).



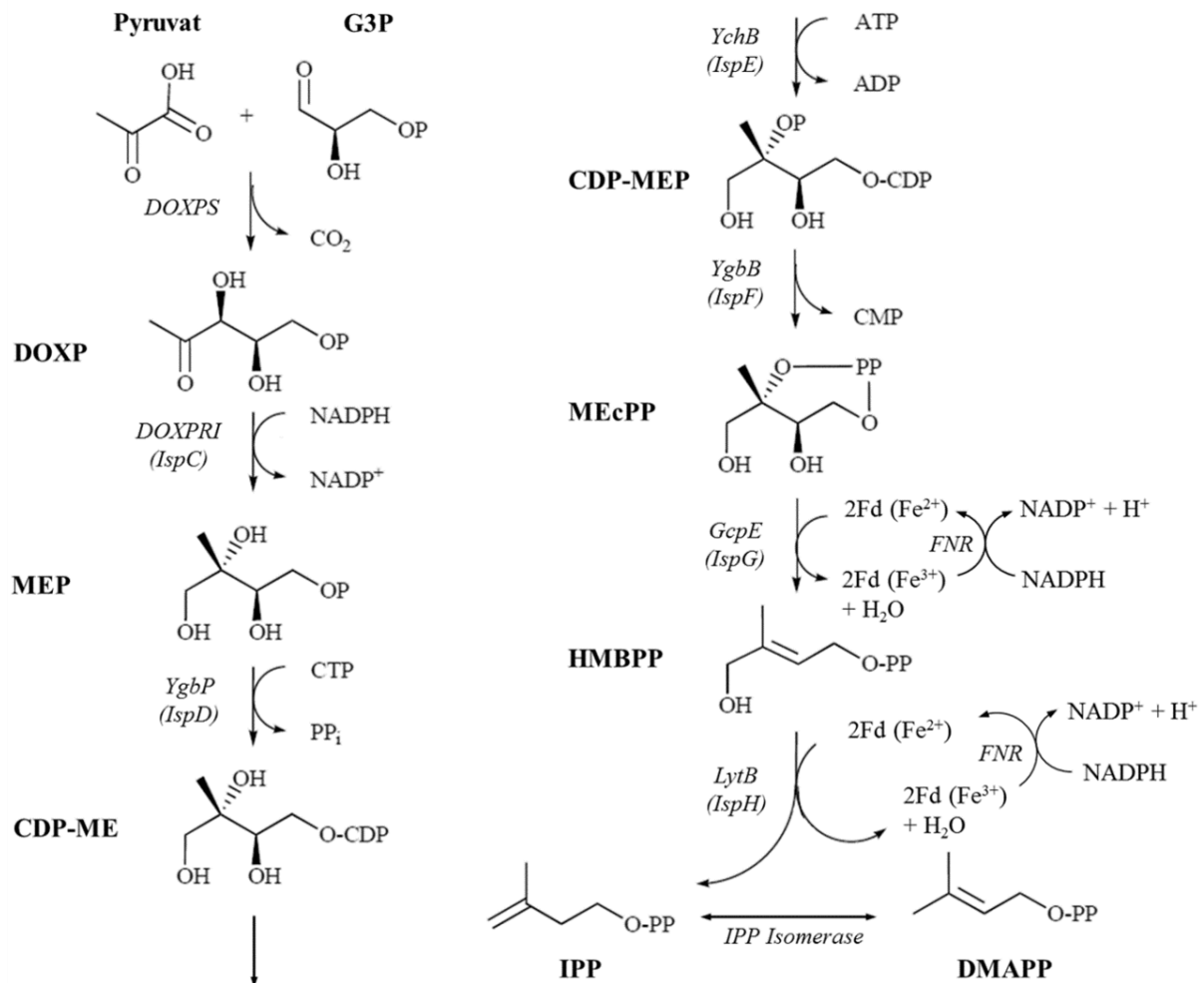
Um gezielt strukturbasierte Inhibitoren der Elektronenübertragung des Ferredoxin-Redoxsystems zu entwickeln, ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Fd bzw. FNR notwendig. Diese ist derzeit jedoch von *T. gondii* noch nicht bekannt. Die Kristallstrukturen sowohl von Fd (Kimata-Arigo *et al.* 2007a) als auch von FNR (Thomsen-Zieger *et al.* 2004, Milani *et al.* 2007, Crobu *et al.* 2009) von *P. falciparum* als weiterer Vertreter der Apicomplexa sind hingegen in der *RCSB protein data bank* hinterlegt. Anhand dieser Modelle sowie anderer bioinformatischer und biochemischer Untersuchungen sind Erkenntnisse über die Struktur und Funktionsweise des Ferredoxin-Redoxsystems von

*T. gondii* vorhanden. Der Abstand sowie die relative Orientierung zwischen dem [2Fe-2S]-Cluster von Fd und der prosthetischen Gruppe von FNR ermöglicht bei direkter Protein-Protein-Interaktion (PPI) eine hohe Elektronentransferrate (Zanetti *et al.* 2006). Die Grenzfläche der beiden Proteine wird durch einen hydrophoben Kern, umgeben von geladenen Resten, gebildet, wobei die basischen Seitenketten hauptsächlich von der Reduktase und die azidischen Seitenketten vornehmlich von Fd stammen. Eine Punktmutation in der FAD-bindenden Domäne des aktiven Zentrums von TgFNR (S267R) erhöht die Affinität zu Fd, führt jedoch gleichzeitig zu einer Inaktivierung des Enzyms (Thomsen-Zieger *et al.* 2004). In ptFNR befindet sich als ptFd-Bindungsstelle eine höhlenartige Struktur, in dessen Zentrum der Dimethylbenzolring des Isoalloxazinrings von FAD exponiert ist (Aliverti *et al.* 2008). Die Aminosäuresequenz von TgFNR und anderer Apicomplexa ist durch drei, z.T. lange Aminosäuren-Insertionen charakterisiert. Eine Insertion aus 28 Aminosäuren ist in der Nähe der FAD- und Fd-Bindungsstelle gelegen, welche auf der Oberfläche exponiert ist (Bednarek *et al.* 2003) und an der PPI mit Fd teilnimmt, um so die katalytische Aktivität und den Elektronentransfer zu verbessern (Pandini *et al.* 2006). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ist die Entwicklung kleiner Moleküle als Dissoziatoren der Interaktion von Fd und FNR und somit die Inhibition der Elektronenübertragung sinnvoll und ein guter Ansatz, um zentral den Metabolismus des Apicoplasten in *T. gondii* aber auch anderer Apicomplexa zu unterbrechen (Seeber *et al.* 2005, Pandini *et al.* 2006).

### 1.2.2 Isoprenoidbiosynthese

Die Isoprenoidsynthese ist einer der essentiellen Stoffwechselwege, der im Apicoplasten von *T. gondii* und anderer Apicomplexa, wie *P. falciparum*, stattfindet (Nair *et al.* 2011). Isoprenoide stellen die größte und vielfältigste Gruppe von Naturstoffen dar, die zahlreiche zelluläre Stoffwechselfunktionen in biologischen Systemen als essentielle Komponenten erfüllen (Buckingham 1993). Aus Isoprenoiden werden diverse Kofaktoren, wie Ubichinon (Coenzym Q) aus der Atmungskette, oder Sekundärmetabolite, wie Artemisinin - ein pflanzliches Sekundärmetabolit zur Behnadrung von *P. falciparum* -, gebildet. Weiterhin dienen Isoprenoide durch Prenylierung der Proteinmodifikation oder als Bestandteile der Zellmembran der Stabilität der Membran, wie z.B. Cholesterol (Gershenzon und Dudareva 2007). Die Grundstruktur der Isoprenoide besteht aus einer fünfgliedrigen Kohlenstoffkette, die aus der Isoprenoidvorstufe Isopentenylpyrophosphat (IPP) und/oder aus dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) aufgebaut ist. Durch das unterschiedliche Zusammenfügen dieser Grundbausteine, u.a. auch Zyklisierungen, ergibt sich eine enorme

Komplexität und Diversität der generierten Stoffe (Connolly und Hill 1992). Die Vorstufen können in verschiedenen Organismen auf zwei unterschiedlichen Wegen synthetisiert werden: So werden in Eukaryoten und Archaeobakterien Isoprenoide über den Mevalonat-Weg generiert. In den meisten Eubakterien und Pflanzen geschieht dies hingegen auf dem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat- (DOXP-) Syntheseweg (auch Methylerythritolphosphat-Weg genannt, Porter und Spurgeon 1981, Rohmer *et al.* 1993). In *T. gondii* sind alle Gene des DOXP-Weges vorhanden und zudem mit einem zweiteiligen Signalpeptid zum Transport in den Apicoplasten ausgestattet (siehe 1.2, Seeber und Soldati-Favre 2010). Die aus der Glykolyse (Zytosol) stammenden und über den Triosephosphat-Transporter in den Apicoplasten transportierten Substanzen Phosphoenolpyruvat und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) werden mit Hilfe der Pyruvatkinase bzw. der Triosephosphat-Isomerase zu Pyruvat bzw. D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) umgewandelt (Saito *et al.* 2008, Lim *et al.* 2010). Aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wiederum entsteht im Apicoplasten über sieben enzymatische Zwischenschritte IPP und DMAPP (siehe Abb. 4). In den letzten beiden Syntheseschritten von IPP und DMAPP konnte *in vitro* bei *P. falciparum* gezeigt werden, dass die dort benötigten Reduktionsäquivalente von Fd über direkte PPI auf LytB und voraussichtlich auch auf GcpE übertragen werden (Rohrich *et al.* 2005). Zudem konnte die Interaktion eines cyanobakteriellen Fd I von *Thermosynechococcus elongatus* (55,7 % Übereinstimmung zu TgFd) mit GcpE, dem vorletzten Enzym der Isoprenoidsynthese, mit Hilfe eines *Yeast Two-Hybrid* Systems gezeigt werden (Okada und Hase 2005). LytB als auch die DOXP-Reduktoisomerase, welche in einem der ersten Schritte der Isoprenoidsynthese beteiligt ist, haben sich in *T. gondii* als essentiell für das Überleben der Parasiten herausgestellt (Nair *et al.* 2011). Da zudem die Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP im Menschen über den Mevalonatweg synthetisiert werden, eignet sich die Isoprenoidsynthese über den DOXP-Weg in *T. gondii* und in anderen Apicomplexa als ein vielversprechendes Wirkstoff-Target. Jedoch weist das gegen *P. falciparum* bereits erfolgreich eingesetzte Antibiotikum Fosmidomycin, ein Inhibitor der DOXP-Reduktoisomerase, in *T. gondii* hingegen nur geringe Aktivität auf (Jomaa *et al.* 1999, Baumeister *et al.* 2011, Nair *et al.* 2011). Der DOXP-Isoprenoidsyntheseweg scheint der am meisten konservierte Stoffwechselweg des Apicoplasten der Apicomplexa zu sein, weshalb weitere Angriffspunkte verschiedener Inhibitoren aktueller Forschungsgegenstand insbesondere bei *P. falciparum* sind (Wiesner und Jomaa 2007, Singh und Ghosh 2013, Imlay *et al.* 2015, Wu *et al.* 2015, Yao *et al.* 2015).



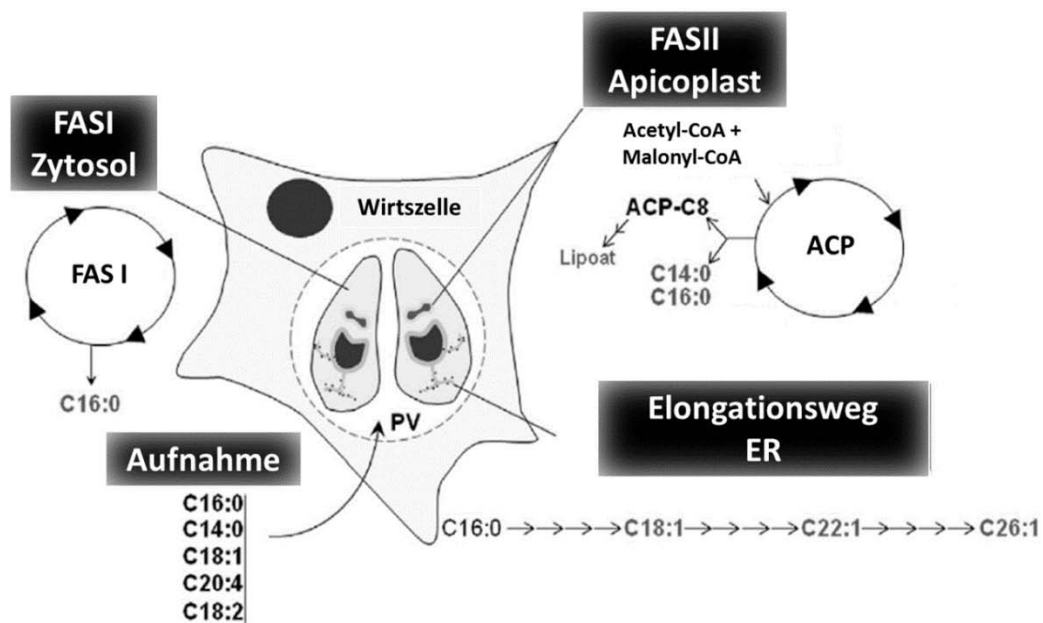
**Abb. 4: Reaktionsschritte der Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP über den DOXP-Syntheseweg**

Als Ausgangsstoffe der Vorstufen von Isoprenoiden dienen Pyruvat und G3P, aus denen über mehrere Zwischenstufen IPP und DMAPP synthetisiert werden. In den letzten beiden Reaktionsschritten werden Elektronen durch das Ferredoxin-Redoxsystem auf LytB und voraussichtlich GcpE übertragen. (Abb. verändert entnommen von Wiesner und Jomaa 2007)

### 1.2.3 Fettsäure- und Liponsäuresynthese

Die Fettsäuresynthese ist wie die Isoprenoidsynthese ein essentieller Stoffwechselweg des Apicoplasten in *T. gondii*. Fettsäuren bilden den Hauptbestandteil von Membranen und stellen somit einen grundlegenden Baustein von Zellen dar. Daneben haben Fettsäuren eine wichtige Funktion als energiespeichernde Moleküle. Auch bei der posttranslationalen Modifikation zahlreicher Proteine (Acylierung), als Vorstufen von sekundären Botenstoffen und Kofaktoren spielen Fettsäuren eine wichtige Rolle. *T. gondii* kann Fettsäuren verschiedener Länge von den Wirtszellen aufnehmen (Charron und Sibley 2002), aber auch mittels drei verschiedener Fettsäuresynthesewege in unterschiedlichen Kompartimenten selbst synthetisieren (siehe Abb. 5). So werden bei der Elongation aus langen, gesättigten Fettsäuren, wie der

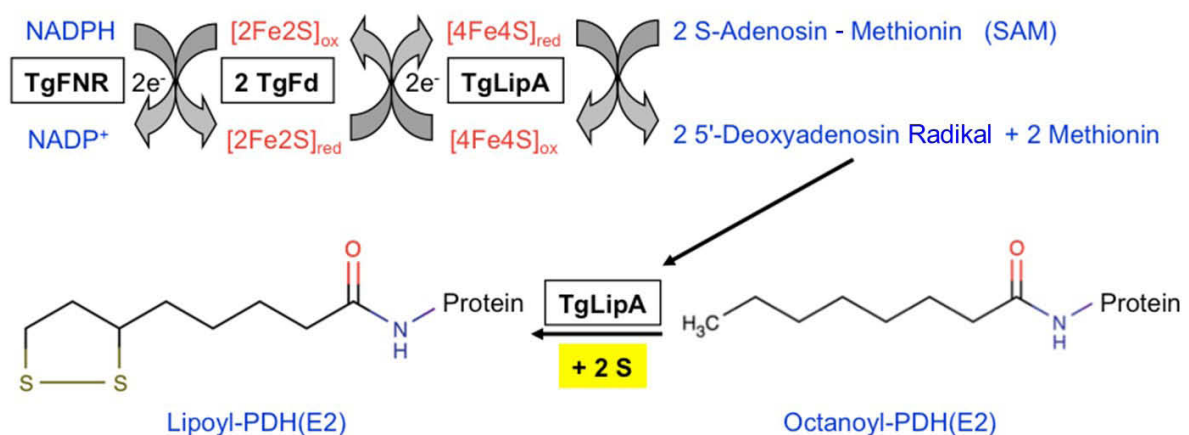
Palmitinsäure (C16:0), sehr lange, einfach ungesättigte Fettsäuren (C18:1, C22:1, C26:1) am endoplasmatischen Retikulum generiert (Ramakrishnan *et al.* 2012). Die dazu notwendige Palmitinsäure wurde entweder von dem Parasiten aufgenommen oder durch die *de novo* Fettsäuresynthese des Typs I oder II (FAS I bzw. II) produziert. Sowohl bei der FAS I als auch bei der FAS II werden Fettsäuren durch den sukzessiven Aufbau von zwei Kohlenstoffatomen (Malonyl-CoA) an eine wachsende Carbonsäure (beginnend mit Acetyl-CoA), welche an das Acylcarrierprotein (ACP) gebunden ist, synthetisiert (Ramakrishnan *et al.* 2013). Die FAS I findet man bei Vertebraten und Pilzen aber auch in verschiedenen Apicomplexa. Im Zentrum steht dabei ein multifunktionales Enzym, welches alle Reaktionszentren zur Synthese von Fettsäuren beinhaltet (Smith *et al.* 2003). In *T. gondii* ist FAS I im Zytosol lokalisiert, dessen Hauptprodukt vornehmlich Palmitinsäure (C16:0) ist. Bei der FAS II, ein weiterer *de novo* Fettsäuresyntheseweg des Parasiten, handelt es sich um den Prototyp des bakteriellen Synthesewegs, der zuerst in *E. coli* beschrieben und charakterisiert wurde. Er findet sich zudem in Organellen von Eukaryoten, die einen endosymbiontischen Ursprung haben, wie in den Chloroplasten von Pflanzen, aber eben nicht in menschlichen Zellen (Seeber und Soldati-Favre 2010). So befinden sich auch in *T. gondii* sämtliche Gene im Apicoplasten, die zur FAS II benötigt werden (Waller *et al.* 1998). Bei der FAS II generiert ein aus vielen individuellen Komponenten bestehender Komplex hauptsächlich Myristin- (C14:0) sowie



**Abb. 5: Fettsäureaufnahme und -synthesewege in *T. gondii***

Fettsäuren werden in *T. gondii* im Zytosol und im Apicoplasten *de novo* beginnend mit einer Reaktion von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA generiert. Eine Elongation der gebildeten oder von der Wirtszelle aufgenommenen Fettsäuren findet am endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Weitere Einzelheiten siehe Text. PV: parasitophore Vakuole. (Abb. verändert entnommen von Coppens *et al.* 2014)

Palmitinsäure, die u.a. in das Zytosol überführt und dort für weitere Vorgänge zur Verfügung stehen (Ramakrishnan *et al.* 2013). Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Bereitstellung von Acetyl-CoA, welches aus Phosphoenolpyruvat über Pyruvat durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex entstanden ist. In der Folge reagiert Pyruvat zu Malonyl-CoA und dient in den FAS II Elongationszyklen als ACP-gebundenes Malonyl zum Anbau an eine wachsende Fettsäure (Ramakrishnan *et al.* 2013). Ein ACP Knockdown zeigte in *T. gondii* eine starke Wachstumsinhibition und im späteren Verlauf zudem ein Absterben der Parasiten, was die FAS II unabdingbar für das Überleben von *T. gondii* macht (Mazumdar *et al.* 2006). Die FAS II ist mit der Liponsäuresynthese eng verbunden: Eine der vier Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase (PDH, Untereinheit PDH-E2), die zur Bereitstellung von CoA benötigt wird, trägt eine Lipoylierung, welche für die enzymatische Aktivität des Komplexes unerlässlich ist (Crawford *et al.* 2006). Liponsäure (LA) stellt in vielen Organismen einen essentiellen Kofaktor dar und ist insbesondere bei Decarboxylierungen von 2-Oxo-Säuren beteiligt (Spalding und Prigge 2010). Das in der FAS II generierte Octanoyl-ACP dient im Apicoplasten bei der LA-Synthese als Ausgangsstoff und wird durch LipB an eine der drei möglichen Domänen (Lysin-Reste) der PDH-E2 übertragen (Thomsen-Zieger *et al.* 2003). Dort findet stufenweise die Insertion von zwei Schwefelatomen an Position C6 und C8 in die Octanoyl-Seitenkette durch LipA statt, woraufhin die Lipoylierung abgeschlossen ist (siehe Abb. 6, Douglas *et al.* 2006). Das bei der LA-Synthese benötigte LipA gehört zu der sog. Radikal-SAM Superfamilie, die als Elektronentransfersystem ein [4Fe-4S]-Cluster gebunden



**Abb. 6: Schema der Liponsäuresynthese unter voraussichtlicher Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems**  
Unter der Mitwirkung des Ferredoxin-Redoxsystems werden die benötigten Elektronen auf den [4Fe-4S]-Cluster von LipA übertragen, um aus SAM die benötigten Radikale zu bilden. Die erhaltenen Radikale bewirken die Insertion von zwei Schwefelatomen an C6 und C8 der an PDH(E2)-gebundenen Octanoyl-Seitenkette zur schließlich lipoylierten Seitenkette. Abb. modifiziert nach Frohnecke *et al.* 2015

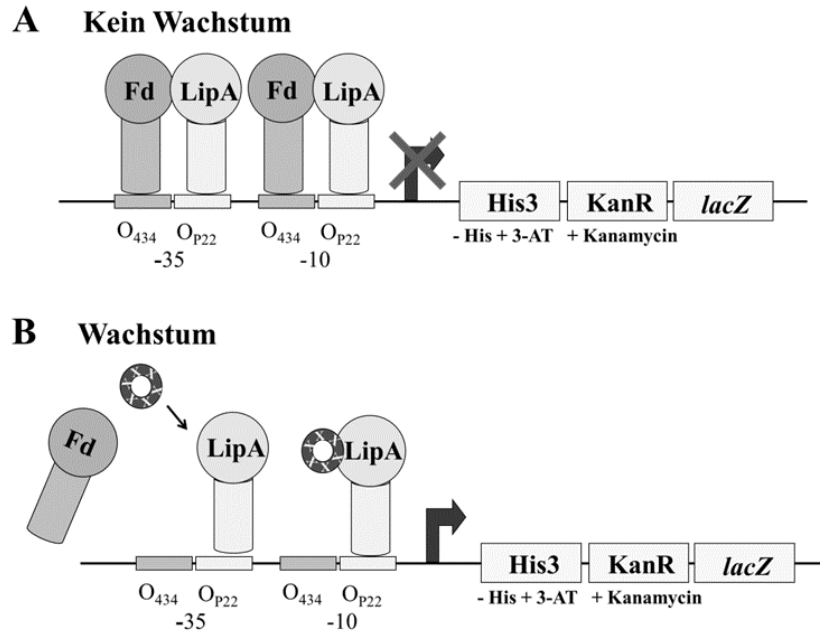
an drei Cys-Seitenketten als Liganden enthält (Lanz und Booker 2015). Es wird vermutet, dass zur Übertragung der beiden Schwefelatome in LipA ein weiteres [4Fe-4S]-Cluster vorhanden ist sowie, dass das Ferredoxin-Redoxsystem an der Elektronenübertragung auf zwei SAM-Moleküle beteiligt ist (Harmer *et al.* 2014, Frohnecke *et al.* 2015). Dies wird dadurch gestützt, dass in Pflanzen und Bakterien bei der Biotinsynthese eine ähnliche Reaktion stattfindet: die Insertion von einem Schwefelatom in Dethiobiotin durch das ebenfalls zur Radikal-SAM Superfamilie gehörende Enzym BioB (Lanz und Booker 2012). Auch dort findet der bei der Reaktion benötigte Elektronentransport über [Fe-S]-Cluster statt, hier unter Mitwirkung des Flavin-Mononukleotid-enthaltenden Flavodoxins und der Flavodoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (Ceccarelli *et al.* 2004, Fugate und Jarrett 2012). Die Abhängigkeit der FAS II von der LA-Synthese (lipoylierte PDH-E2) und umgekehrt (Octanoyl-ACP als Ausgangsprodukt der Lipoylierung) sowie die voraussichtliche Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems bei der LA-Synthese machen diese beiden Stoffwechselwege zu weiteren, verheißungsvollen Wirkstoff-Targets im Apicoplasten (Mazumdar und Striepen 2007, Storm und Muller 2012). Zudem befindet sich die PDH in *T. gondii* - anders als in Eukaryoten bzw. in Pflanzen, bei denen die PDH in den Mitochondrien bzw. Mitochondrien und Plastiden lokalisiert ist - ausschließlich im Apicoplasten. Verschiedene Wirkstoffe (z.B. Triclosan und -derivate, Thiolactamin) aber auch Wirkstoffklassen (z.B. Benzimidazole) mit dem Angriffspunkt FAS II wurden bereits in *T. gondii* aber auch *P. falciparum* erfolgreich getestet (McLeod *et al.* 2001, Surolia und Surolia 2001, Perozzo *et al.* 2002, Afanador *et al.* 2013, Wilkinson *et al.* 2014). Bisher zeigten diese Substanzen jedoch Off-Target Effekte, weshalb die erhaltene Wirkung nicht auf die alleinige Inhibition der FAS II zurückzuführen ist (Seeber und Soldati-Favre 2010, Wilkinson *et al.* 2014). Die FAS II als auch die LA-Synthese bleiben weiterhin Gegenstand der Forschung bei der aktuellen Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen *T. gondii* und andere Apicomplexa (Afanador *et al.* 2013, Belluti *et al.* 2013, Cheng *et al.* 2013, Carballeira *et al.* 2014).

#### 1.2.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des *Reverse Two-Hybrid Systems*

Bei den Elektronenübertragungsreaktionen des Ferredoxin-Redoxsystems sowie den möglichen beteiligten Stoffwechselwegen im Apicoplasten (siehe 1.2.1 - 1.2.3) handelt es sich um direkte Protein-Protein-Interaktionen (PPI). Zur Analyse von PPI stehen eine Vielzahl von Systemen sowohl in Eu- als auch in Prokaryoten zur Verfügung. Das bakterielle *Reverse Two-Hybrid* System (RTHS, Di Lallo *et al.* 2001) ermöglicht im Gegensatz zum *Yeast Two-Hybrid* System die Untersuchung der Fd Interaktionspartner im Zytosol der Bakterien,



das, wie der Apicoplast, eine reduzierende Umgebung darstellt (Gallagher und Prigge 2010). Das RTHS zur Protein-Protein-Interaktionsstudie von Heterodimeren wird von einem chimären Operator gebildet, der aus zwei Hälften der Operatoren der Phagen P22 und 434 besteht. Dieser Operator wird von einem Hybrid-Repressor erkannt und gebunden, der aus zwei chimären Monomeren zusammengesetzt ist. Das eine Monomer ist N-terminal mit dem Operator des P22-Phagen fusioniert, das andere mit dem des Phagen 434 (Di Lallo *et al.* 2001). Die C-terminale Region des Repressors besteht jeweils aus einem der Proteine zur Interaktionsanalyse. Kommt es zu einer Dimerisierung, also Interaktion, der zu untersuchenden Proteine, binden die mit den jeweiligen Proteinen verbundenen Operatoren (P22 oder 434) an die Repressoren, so dass die nachgeschalteten Reportergene in der Folge nicht mehr abgelesen werden (siehe Abb. 7A, Horswill und Benkovic 2006). Bei einem der drei Reportergene handelt es sich um ein *lacZ*-Gen, welches beim Ausbleiben einer Interaktion sowie ohne Induktion  $\beta$ -Gal exprimiert. Nach Induktion der Expression und Interaktion der zu untersuchenden Proteine wird das *lacZ*-Gen reprimiert, welches eine geringere  $\beta$ -Gal-Aktivität zur Folge hat. Des Weiteren befinden sich in der Reporter-kassette zum einen ein *HIS3*- und zum anderen ein KanR-Gen (Horswill *et al.* 2004). Das *HIS3*-Genprodukt komplementiert eine Histidin Auxotrophie der RTHS-Stämme und ermöglicht neben dem KanR-Genprodukt bei Verwendung eines Minimalmediums ohne Histidin bei Zugabe von 3-AT und Kan eine Selektion (Joung *et al.* 2000). Bei 3-AT handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes, welches eine chemische Kontrolle der Hintergrund Expression ermöglicht (Brennan und Struhl 1980). Durch das Ausbleiben des Bakterienwachstums bei entsprechender Zusammensetzung des Mediums kann aufgrund der Reportergene eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 7A). Das RTHS bietet zudem die Möglichkeit einer Kombination mit einer zyklischen Peptid-Bank, wie der *Split Intein-Mediated Circular Ligation Of Peptides and Proteins* (SICLOPPS) Technologie, was zur Entdeckung von Dissoziatoren der Interaktionsproteine führt (Scott *et al.* 2001, Horswill *et al.* 2004). Die SICLOPPS-Methode basiert auf der sog. Intein-Chemie, bei der die gewünschte Peptid-Sequenz von zwei Teilen eines Split-Inteins flankiert wird. Beim Protein-Spleißen kommt es dann zu einem Ringschluss der von den Split-Inteinen umgebenden Peptid-Sequenz und zur Bildung von zyklischen Peptiden (Scott *et al.* 1999). Beinhaltet die Peptid-Bank ein zyklisches Peptid, welches die PPI aufheben kann, führt dies zum Ablesen der Reporter-kassette und somit zu einem Wachstum der Bakterien bei entsprechenden Selektionsbedingungen (siehe Abb. 7B). Die Entdeckung von Dissoziatoren der in 1.2.1-1.2.3



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des *Reverse Two-Hybrid Systems***

**A** Nach Expression und Interaktion der Fusionsproteine jeweils bestehend aus dem gewünschten Protein (hier: Fd oder LipA) und dem Operatorteil aus den Phagen 434 oder P22 kommt es zur Bindung an die Operatorregionen, was zu einer Repression der nachgeschalteten Reporterkassette führt. Bei geeigneter Medienzusammensetzung wachsen die Bakterien nicht. Weitere Einzelheiten siehe Text. **B** Inhibiert ein Dissoziator die Interaktion der Proteine bleibt die Bindung der Fusionsproteine an die Operatorsequenzen aus und es kommt zum Ablesen der Reportergene, wodurch ein Wachstum der Bakterien möglich ist. (Abb. verändert entnommen von Horswill *et al.* 2004)

beschriebenen PPI der verschiedenen Stoffwechselwege des Apicoplasten bietet die Möglichkeit der Validierung eines neuen Pharmakophoren in *T. gondii* (Fd-FNR, Fd-LipA, Fd-LytB) und somit auch gegebenenfalls für andere Apicomplexa (Seeber *et al.* 2005).

### 1.3 Möglichkeiten der genetischen Manipulation durch konditionale Systeme zur funktionellen Analyse von essentiellen Genen in *Toxoplasma gondii*

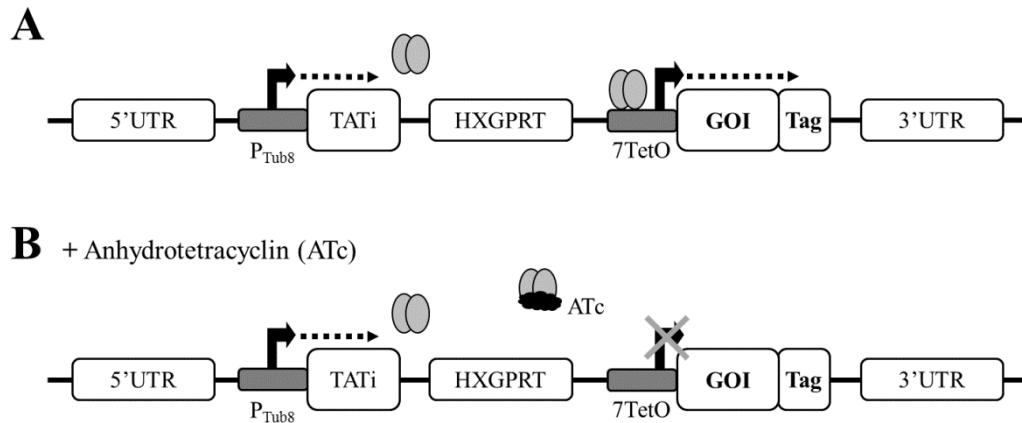
Bei der funktionellen Analyse essentieller Gene, wie es für Fd aufgrund der voraussichtlich zentralen Stellung des Ferredoxin Redoxsystems im Metabolismus des Apicoplasten angenommen wird (siehe 1.2), können in *T. gondii* verschiedene Systeme zum Einsatz kommen. Um die Funktion essentieller Proteine im haploiden Organismus *T. gondii* untersuchen zu können, werden konditionelle Systeme verwendet, die eine sichere und enge Regulierung der Gen-Aktivität ermöglichen. Neben der im Folgenden näher beschriebenen Knockdown- bzw. Knockout-Strategie wird zudem ein weiteres System zur Regulation der

Proteinstabilität eingesetzt. In diesem Liganden-kontrollierten System wird das gewünschte Protein mit einer Destabilisierungsdomäne (ddFKBP) fusioniert und ermöglicht so die Degradation bzw. reversible Stabilisierung dieses Proteins (Herm-Gotz *et al.* 2007). Das ddFKBP-System ist insbesondere bei der Analyse von Komponenten der Signalkaskaden oder des Zelltransports im Zytosol von Vorteil (Ferguson und Dubremetz 2014). Für die Untersuchung von Proteinen, die sich in Organellen befinden, eignet es sich jedoch nicht, da die Proteine, die an die Destabilisierungsdomäne fusioniert sind, für das im Zytosol befindliche Proteasom zugänglich sein müssen (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014).

Bei den nachfolgend beschriebenen Systemen wird der gewünschte Genort mit einem entsprechenden Konstrukt mittels doppelt homologer Rekombination ersetzt. In *T. gondii* bleibt im Gegensatz zu anderen Protozoon die homologe Rekombination nach dem Einbringen von DNA-Segmenten mit kurzen Homologie-Bereichen aus, so dass vermehrt eine zufällige Integration in das Genom stattfindet (Ferguson und Dubremetz 2014). Wird jedoch ein Stamm verwendet, bei dem das Ku80-Protein des *non-homologous end-joining* (NHEJ)-Weges der DNA-Reparatur deletiert ist ( $\Delta$ Ku80), wird ein effizientes Ersetzen bzw. Modifizieren des gewünschten Gens möglich (Fox *et al.* 2009, Huynh und Carruthers 2009).

### **Tetracyclin-induzierbares System zur Kontrolle der Transkription**

Das Tetracyclin-induzierbare System basiert auf einem *Tet-Off* System, bei dem die Expression des gewünschten Gens durch die Zugabe von Tetracyclin oder –derivaten reprimiert wird. Dabei bildet ein Tetracyclin-Repressor (TetR) fusioniert mit VP16 (*virion protein 16* - eine Transaktivator Domäne aus *Herpes simplex*) einen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA), dem eine Tetracyclin-Operatorsequenz (7TetO) nachfolgt. Bindet das tTA-Protein an die 7TetO wird die Transkription des nachfolgenden Gens aktiviert (siehe Abb. 8A). Tetracyclin und –derivate können an tTA binden, wodurch tTA selbst nicht mehr an 7TetO binden kann und die Aktivierung der Transkription des nachgeschalteten Gens ausbleibt (siehe Abb. 8B). Aufgrund einer mangelnden Aktivität von tTA in *T. gondii* wird eine angepasste Variante des Transaktivators verwendet (TATi, *trans-activator trap identified*), um so eine sehr gut induzierbare Regulation zu erhalten (Meissner *et al.* 2002). Dieses Knockdown-System wird vielfach zur funktionellen Analyse verschiedener Gene angewandt (Limenitakis und Soldati-Favre 2011).

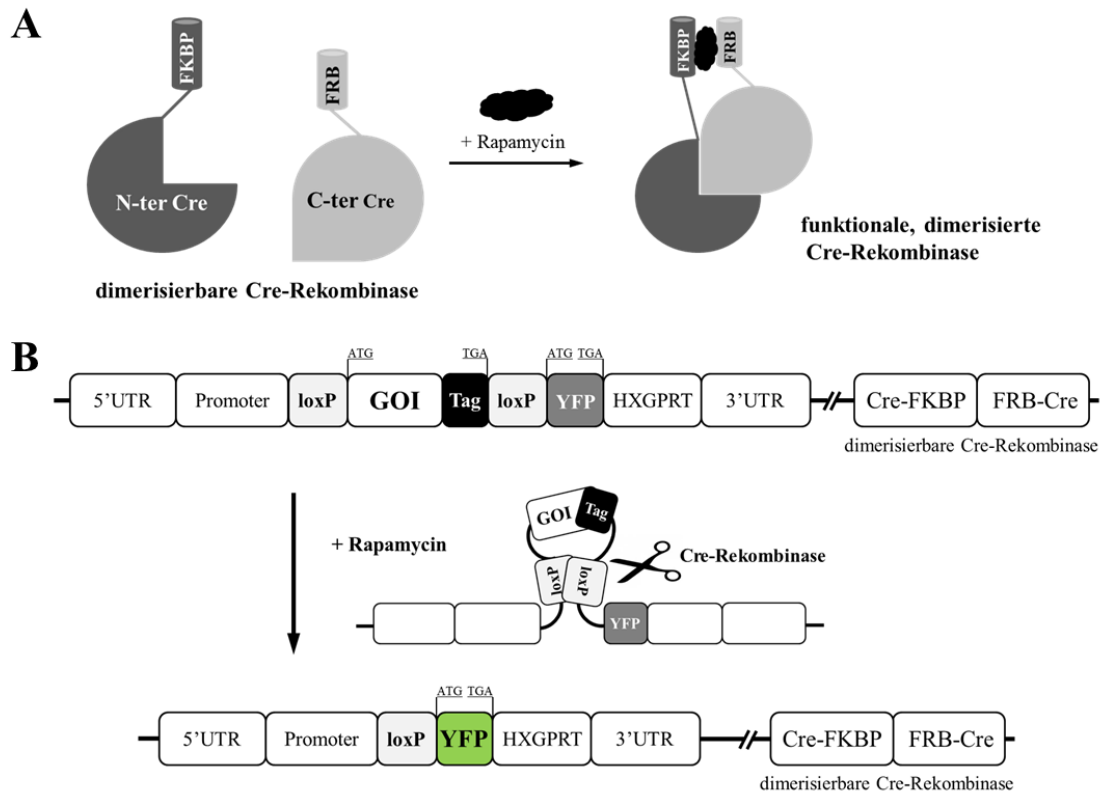


**Abb. 8: Transkriptionskontrolle durch eine Tetracyclin-induzierbare Promoterregion**

**A** Die Tetracyclin oder –derivate induzierbare Promoterregion besteht aus einem konstitutiven Tub8-Promoter ( $P_{Tub8}$ ), der einen Transaktivator exprimiert (TATi, *trans-activator trap identified*), und einer Tetracyclin-Operatorsequenz (7TetO), die die Expression des nachfolgenden markierten Gens (GOI + Tag) nach Bindung des Transaktivators ermöglicht. **B** Anhydrotetracyclin bindet an den Transaktivator, so dass in der Folge eine Bindung an die Tetracyclin-Operatorsequenz nicht mehr möglich ist und die Transkription des gewünschten Gens ausbleibt. (HXGPRT: Selektionsmarker, 3'/5'UTR: flankierende Genabschnitte, Abb. modifiziert nach Ferguson und Dubremetz 2014)

### Exzision eines Gens durch eine dimerisierbare Cre-Rekombinase

Ein Cre-Rekombinase vermittelter, durch die Exzision des gewünschten Gens hervorgerufener Gen-Knockout wird durch die Verwendung eines speziellen Cre-Rekombinase exprimierenden *T. gondii*-Stammes erhalten. Die Cre-Rekombinase liegt in zwei getrennten, inaktiven Fragmenten und jeweils fusioniert an eines der beiden Rapamycin Bindungsproteine (FKBP und FRB) vor. Durch die Zugabe des Liganden Rapamycin dimerisieren beide Komponenten und das funktionelle Enzym ist wieder hergestellt (siehe Abb. 9A, Jullien *et al.* 2003, Jullien *et al.* 2007). Der Vektor enthält neben dem von zwei identischen Cre-Rekombinase 34 bp Erkennungssequenzen (loxP) flankierten Gen und nachgeschaltet an die zweite loxP-Sequenz ein Reportergen (YFP) gefolgt von einem Selektionsmarker (HXGPRT). Nach Integration durch homologe Rekombination kann die Cre-Rekombinase durch Zugabe von Rapamycin dimerisieren (siehe Abb. 9B). Die Cre-Rekombinase katalysiert die Exzision des loxP-flankierten Gens, woraufhin die Expression des Reportergens ermöglicht wird und die so erhaltenen Parasiten grün fluoreszieren (siehe Abb. 9B, Andenmatten *et al.* 2013). Das DiCre-System wurde bereits mehrfach seit der ersten Veröffentlichung von Andenmatten *et al.* 2013 erfolgreich zur Generierung von Knockout-Stämmen verwendet und bietet den Vorteil eines reinen Knockouts, da das Gen von Interesse vollständig aus dem Genom herausgeschnitten wird (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014).



**Abb. 9: Funktionsweise DiCre System**

**A** Die Cre-Rekombinase liegt als zwei getrennte, inaktive Fragmente (N- bzw. C-terminal) und jeweils fusioniert an eines der beiden Rapamycin-Bindungsproteine (FKBP und FRB) vor. Nach Zugabe des Liganden Rapamycin dimerisieren die Rapamycin-Bindungsproteine und dadurch beide Komponenten der Cre-Rekombinase, so dass das funktionelle Enzym wieder hergestellt ist. **B** Schema der Funktionsweise der Exzision eines loxP-flankierten Gens nach Rapamycin-Behandlung. Die nach Rapamycin-Zugabe dimerisierte Cre-Rekombinase schneidet das entsprechende loxP-flankierte Gen (GOI) heraus und bewirkt so die Expression des *yellow fluorescent proteins* (YFP) und somit eine grüne Fluoreszenz der Parasiten. (ATG = Startcodon, TGA = Stoppcodon, Schemata modifiziert nach Andenmatten *et al.* 2013)

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

*Toxoplasma gondii* besitzt ein Plastid-ähnliches Organell, den Apicoplasten, der mehrere, darunter essentielle Stoffwechselwege beherbergt, die aufgrund des pflanzlichen Ursprungs des Organells im Menschen so nicht vorkommen. Das einzig bekannte Redoxsystem im Apicoplasten ist das Ferredoxin-Redoxsystem, welches aus der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) und Ferredoxin (Fd) besteht. Fd als Elektronendonator gibt Elektronen an mindestens zwei essentielle Stoffwechselwege, an die Isoprenoid- und aller Voraussicht nach auch an die Liponsäuresynthese. Das Ferredoxin-Redoxsystem nimmt demnach eine zentrale Rolle im Metabolismus des Apicoplasten ein und eignet sich in Abwesenheit dieser Stoffwechselvorgänge im Menschen hervorragend als Wirkstoff-Target.

Um eine mögliche Elektronenübertragung von Fd bei der Liponsäuresynthese zu ermitteln, ist es ein Ziel dieser Arbeit die direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) von Fd und der Liponsäuresynthase (LipA) zu untersuchen. Dazu wird das bakterielle Reverse Two-Hybrid System (RTHS) verwendet, durch welches das Maß der Interaktion von Fd und LipA quantitativ durch  $\beta$ -Galaktosidase Assays gezeigt werden kann. Das RTHS kann zudem für eine Kombination mit einer zyklischen Peptidbank genutzt werden, um Dissoziatoren der Fd-LipA Interaktion zu finden. Dazu sind stringente Screeningbedingungen notwendig, die durch Titration der beiden Reportergene KanR und *HIS3* ermittelt werden sollen. Die Optimierung der Medienzusammensetzung stellt daher eine wesentliche Grundlage der Etablierung des Fd-LipA RTHS dar. Neben Fd und LipA soll die Interaktion von Fd und FNR mit Hilfe des RTHS nachgewiesen werden. Deren Interaktion konnte bereits erfolgreich in einem Yeast-Two Hybrid System gezeigt werden (Thomsen-Zieger *et al.* 2004). Um die Funktionsweise des Systems zu kontrollieren, wird die bereits in diesem System nachgewiesene PPI der murinen Ribonukleotid-Reduktase Untereinheiten mR1/R2 verwendet (Horswill *et al.* 2004).

Mehrere Stoffwechselwege des Apicoplasten, welche Elektronen für ihre Funktionsweise benötigen, haben sich bereits als essentiell für das Überleben von *T. gondii* erwiesen (Mazumdar *et al.* 2006, Nair *et al.* 2011). Da das Ferredoxin-Redoxsystem das einzig bekannte Redoxsystem des Apicoplasten darstellt (Seeber und Soldati-Favre 2010) und zudem der Elektronentransfer an die Isoprenoidsynthese nachgewiesen wurde (Rohrich *et al.* 2005), ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit die zentrale Rolle von Fd zu untersuchen. Dazu sollen zwei Strategien zur konditionalen genetischen Manipulation in *T. gondii* zum Einsatz kommen, wodurch Fd entweder herausgeschnitten (Knockout) oder dessen Expression

reprimiert wird (Knockdown). Zu Beginn dieser Arbeit (2011) stellte das Tetracyclin-induzierbare Knockdown-System den Goldstandard für die genetische Analyse von essentiellen Genen dar, weshalb dieses System zur Herstellung eines Fd Gen-Knockdowns zum Einsatz kommt. Die Repression der Expression von Fd soll durch Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden. Die Auswirkungen der Fd Herabregulation soll in verschiedenen Versuchen, wie Plaque-, Replikations- und Motilitätsassays sowie einer Fettsäurenanalyse mittels GC-MS, analysiert werden. Mit Hilfe des DiCre-Systems, welches Andenmatten *et al.* 2013 etablierten, soll zudem ein Fd Gen-Knockout durch eine Rapamycin-induzierte Exzision von Fd durch eine dimerisierbare Cre-Rekombinase hergestellt werden. Bei einem tatsächlichen Fd Gen-Knockout wird wegen der zentralen Stellung von Fd ein komplexer biochemischer Phänotyp erwartet, der letztendlich eine letale Wirkung auf *T. gondii* haben sollte. Dies soll den grundsätzlichen Nachweis darstellen, dass Fd unverzichtbar für das Überleben der Parasiten ist, und dass zudem das Ferredoxin-Redoxsystem ein vielversprechendes Wirkstoff-Target ist.

## 2. Material

### 2.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in den Tab. 23, Tab. 24 und Tab. 25 im Anhang aufgeführt.

### 2.2 Medien, Puffer und Lösungen

#### 2.2.1 Medien

Tab. 1 Medien und Agar

Bezeichnung	Zusammensetzung
D1-Zellkulturmedium	DMEM <i>high glucose</i> (4.5 g/l) and <i>stable glutamine</i> versetzt mit 1 % hitzeinaktiviertem FKS und 100 µg/ml Pen/Strep (1x)
<sup>13</sup> C-Glukose D1-Zellkulturmedium ( <sup>13</sup> C-D1-Medium)	DMEM w/o <i>glucose and glutamine</i> versetzt mit 1 g/l <sup>13</sup> C-Glukose, 4 mM L-Glutamin, 1 % hitzeinaktiviertem FKS und 100 µg/ml Pen/Strep (1x)
DMEM Zellkulturmedium	DMEM <i>high glucose</i> (4.5 g/l) mit stabilem Glutamin versetzt mit 2 oder 10 % hitzeinaktiviertem FKS und 100 µg/ml Pen/Strep (1x)
Hogness Einfriermedium (10x)	36 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 13 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 20 mM Na-citrat; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 40 % (v/v) Glycerol (pH 7,5)
LB-Agar	LB-Medium mit 1.5 % (w/v) Agar-Agar versetzt
LB-Medium	10 g/l Bactotrypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl (pH 7,0)
MOPS-Agar	1x MOPS Mixtur; 1,98 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 % (w/v) Glucose; 1.5 % (w/v) Agar-Agar; 0,01 % TTC
MOPS-Minimalmedium	1x MOPS Mixtur; 1,98 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 % (w/v) Glucose
MOPS-Mixtur (10x)	0,4 M MOPS; 40 mM Tricin; 0,1 mM FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 95 mM NH <sub>4</sub> Cl; 2,76 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5 µM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O; 5,25 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 M NaCl; 0.02 % (v/v) Spurenelement-Stammlösung (Neidhardt <i>et al.</i> 1974)
SOB-Medium	20 g/l Bactotrypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 7,0)
SOC-Medium	SOB-Medium versetzt mit 20 mM Glukose



## 2.2.2 Puffer und Lösungen

**Tab. 2 Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Cytomix	120 mM KCl; 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,6); 25 mM HEPES (pH 7,6); 2 mM EGTA; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
DNA Ladepuffer (10x)	0,3125 % (w/v) Bromphenolblau; 62,5 % (v/v) Glycerol
<i>GelGreen</i> <sup>TM</sup> Färbelösung	<i>GelGreen</i> <sup>TM</sup> 1:3300 in ddH <sub>2</sub> O verdünnt
Inoue-Transformationspuffer	55 mM MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O; 15 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O; 250 mM KCl; 10 mM PIPES (pH 6,7)
Klinikfixans	2,5 % Glutaraldehyd; 1 % PFA in 0,05 M HEPES (pH7,2)
Kristallviolett-Färbelösung	0,2 % (w/v) in 2 % (v/v) Ethanol
PBS	13,7 mM NaCl; 8,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
Permeabilisierungspuffer	100 mM Glycin und 0,25 % (v/v) Triton X-100 in PBS (pH 7,2)
Spurenelement-Stammlösung	0,15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O; 20,1 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 1,5 mM CoCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM CuSO <sub>4</sub> ; 4 mM MnCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM ZnCl <sub>2</sub>
TAE Elektrophorese Puffer	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
Toxo-Fixierlösung	4 % (v/v) Formaldehyd; 250 mM NaCl in PBS
Zelllyse-Reagenz (10x)	0,5 M HEPES (pH 7,5); 10 % (v/v) Triton X-100; 4 % (v/v) Tergitol NP-9; 0,38 mM Polymyxin B
Z-Puffer	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O; 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O

**Tab. 3 Antibiotikallösungen und deren eingesetzte Konzentration**

Antibiotikum	Lösungs- mittel	Konz. der Stammlösung [mg/ml]	Konz. der Arbeitslösung (bei genomischer Integration) [µg/ml]
Ampicillin	ddH <sub>2</sub> O	100	100 (50)
Chloramphenicol	EtOH	34	34
Gentamicin	ddH <sub>2</sub> O	30	15 (5)
Kanamycin	ddH <sub>2</sub> O	50	50 (50 oder 100)
Spectinomycin	ddH <sub>2</sub> O	100	50 (35)
Tetracyclin	EtOH	20	10
Timentin	ddH <sub>2</sub> O	50	25

## 2.3 Enzyme und Antikörper

### 2.3.1 Enzyme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (*Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, RecA, T4 DNA Polymerase) wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Lediglich die *Mango Taq™* Polymerase wurde von Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland) hergestellt.

### 2.3.2 Antikörper

Tab. 4 Antikörper und eingesetzte Verdünnungen

Antikörper (Ursprung)	Hersteller	Verdünnung
$\alpha$ -c-Myc (Klon 9E10) (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	1:4000
$\alpha$ -Fd (Kaninchen)	Seeber <i>et al.</i> 2005	1:500
$\alpha$ -HA (Klon 3F10) (Ratte)	Roche Diagnostics GmbH, Berlin, D	1:100
$\alpha$ -SAG1 (Klon DG52) (Maus)	Burg <i>et al.</i> 1988	1:1000
Streptavidin-Cy5	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK	1:2500
Streptavidin-Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D	1:4000
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D	1:1000
Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D	1:4000
Ziege- $\alpha$ -Maus Dylight® 650	Agrisera AB, Vännäs, Schweden	1:1000
Ziege- $\alpha$ -Ratte Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D	1:1000

## 2.4 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.4.1 Plasmide

Tab. 5 Plasmide (Plasmidkarten fett-markierter Plasmide siehe 7.4)

Bezeichnung	Charakteristika und Quelle	AB-Resistenz
Cosmid PSBM821	erhalten von D. Sibley (Washington University in St. Louis, USA), weitere Informationen: <a href="http://www.toxodb.org/toxo/">http://www.toxodb.org/toxo/</a> , generiert aus RH (Typ I)-Stamm	-

Bezeichnung	Charakteristika und Quelle	AB-Resistenz
<b>pAH152</b> (3653 bp)	CRIM-Plasmid (Haldimann und Wanner 2001), u.a. P <sub>RhaS</sub> , att <sub>HK</sub>	Gent
pAH69 (4951 bp)	CRIM Helferplasmid (Haldimann und Wanner 2001), enthält Phagen-Integrase Int <sub>HK022</sub>	Amp
pB42AD-FNR <sub>mut</sub> (7506 bp)	TgFNR (cDNA) mit C-terminalen HA-Tag sowie zwei Punktmutationen (Q242R and S267R; Thomsen-Zieger <i>et al.</i> 2004)	Amp
pET28a-TgFNR (6440 bp)	TgFNR (cDNA) mit N-terminalem Hexahistidin-Tag, bakterieller Expressionsvektor pET28a (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D; Pandini <i>et al.</i> 2006)	Amp
pET28b-TgFd (5585 bp)	TgFd (cDNA, siehe Abb. 33) mit N-terminalem Hexahistidin-Tag, bakterieller Expressionsvektor pET28b (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D; Pandini <i>et al.</i> 2006)	Kan
<b>pG265</b> (7700 bp)	= p5RT70loxPKillerRedloxPYFP-HX Tub8-Promoter, loxP-flankiertes KillerRed, YFP-Gen, HXGPRT-Selektionsmarker (Andenmatten <i>et al.</i> 2013)	Amp
<b>pG265-Fd*</b> (12992 bp)	wie pG265, Fd-Myc und endogene Promoterregion anstatt KillerRed und Tub8-Promoter (Fd-Sequenz siehe Abb. 32, interner Name: pG265-ePFd)	Amp
<b>pG265-T8Fd*</b> (12979 bp)	wie pG265-Fd, Tub8-Promoter anstatt endogener Promoterregion (Fd-Sequenz siehe Abb. 32)	Amp
pGRA-GFP-UPRT (11600 bp)	Komplementations-Vektorgerüst mit UPRT-UTRs sowie HA-Tag, erhalten von Jon P. Boyle (University of Pittsburgh, USA; Reese <i>et al.</i> 2011)	Amp
<b>pGRA-UPRT-Fd*</b> (14099 bp)	Komplementationsplasmid wie pGRA-GFP-UPRT, zusätzlich Fd mit endogener Promoterregion integriert (Sequenz siehe Abb. 32)	Amp
<b>piko-1x*</b> (7039 bp)	wie piko-COR, COR sowie entsprechende UTR entfernt und RE-Schnittstellen ( <i>Sbf</i> I, <i>Swa</i> I, <i>Pme</i> I) eingefügt	Amp
piko-COR (8649 bp)	= p5'COR-T8TATi1-HX-tetS1mycNtCOR Tetracyclin-induzierbarer Promoter, Selektionsmarker HXGPRT (Meissner <i>et al.</i> 2002) erhalten von D. Soldati-Favre (Université de Genève, Schweiz)	Amp
<b>piko-Fd*</b> (10993 bp)	Tetracyclin-induzierbarer Promoter (Meissner <i>et al.</i> 2002), Selektionsmarker HXGPRT, Fd-Myc + Fd-3'UTR/5'UTR (Fd-Sequenz sowie 3' und 5'UTR-Sequenzen siehe Abb. 32)	Amp
pNF1* (3010 bp)	chimärer Repressorkomplex (P22 und 434) von pTHCP14; Rhamnose-induzierbarer Promoter (P <sub>RhaS</sub> ) von pAH152	Gent
pNF1-Fd-LipA* (4412 bp)	wie pNF1, zusätzlich TgFd (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b-TgFd mit P22 fusioniert sowie TgLipA aus pS1-TgLipA mit 434 fusioniert	Gent
pNF1-Fd-FNR* (4396 bp)	wie pNF1, zusätzlich TgFd (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b-TgFd mit P22 fusioniert sowie TgFNR aus pET28a-TgFNR mit 434 fusioniert	Gent

Bezeichnung	Charakteristika und Quelle	AB-Resistenz
pNF1-Fd-FNR $mut^*$ (4426 bp)	wie pNF1, zusätzlich <i>TgFd</i> (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b- <i>TgFd</i> mit P22 fusioniert sowie <i>TgFNRmut</i> aus pB42AD-FNR $mut$ mit 434 fusioniert	Gent
pNF1-FNR-LipA $^*$ (5174 bp)	wie pNF1, zusätzlich <i>TgFNR</i> (cDNA, siehe Abb. 33) aus pS1-TgFNR mit P22 fusioniert sowie <i>TgLipA</i> aus pS1-TgLipA mit 434 fusioniert	Gent
pNF2 $^*$ (2883 bp)	chimärer Repressorkomplex (P22 und 434) und IPTG-induzierbarer Promoter ( $P_{Tac}$ ) von pTHCP14; Vektorgerüst von pAH152	Gent
pNF2-Fd-LipA $^*$ (4285 bp)	wie pNF2, zusätzlich <i>TgFd</i> (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b- <i>TgFd</i> mit P22 fusioniert sowie <i>TgLipA</i> aus pS1-TgLipA mit 434 fusioniert	Gent
pNF2-Fd-FNR $^*$ (4269 bp)	wie pNF2, zusätzlich <i>TgFd</i> (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b- <i>TgFd</i> mit P22 fusioniert sowie <i>TgFNR</i> aus pET28a-TgFNR mit 434 fusioniert	Gent
pNF2-Fd-FNR $mut^*$ (4299 bp)	wie pNF2, zusätzlich <i>TgFd</i> (cDNA, siehe Abb. 33) aus pET28b- <i>TgFd</i> mit P22 fusioniert sowie <i>TgFNRmut</i> aus pB42AD-FNR $mut$ mit 434 fusioniert	Gent
pNF2-FNR-LipA $^*$ (5047 bp)	wie pNF2, zusätzlich <i>TgFNR</i> (cDNA) aus pS1-TgFNR mit P22 fusioniert sowie <i>TgLipA</i> aus pS1-TgLipA mit 434 fusioniert	Gent
pS1-TgLipA (4568 bp)	<i>TgLipA</i> (cDNA) mit N-terminalen Hexahistidin-Tag (Thomsen-Zieger <i>et al.</i> 2003)	Amp
pSAG1-Cre	Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines SAG1-Promoters	Amp
pTHCP14 (6137 bp)	chimärer Repressorkomplex P22 und 434, IPTG-induzierbarer $P_{Tac}$ -Promoter, Vektorgerüst von pMAL-c2x (New England Biolabs) (Horswill <i>et al.</i> 2004)	Amp
pTHCP32 (Größe unbekannt)	wie pTHCP14, zusätzlich murine Ribonukleotid Reduktase Untereinheiten mR1 bzw. mR2 fusioniert mit P22 bzw. 434 (Horswill <i>et al.</i> 2004)	Amp
pUC19 (2686 bp)	Standard-Klonierungsvektor mit <i>multiple cloning site</i> , LacZa	Amp

\*Plasmid innerhalb dieser Arbeit generiert, Klonierungsstrategie siehe Tab. 15

## 2.4.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tab. 26 im Anhang aufgeführt.

## 2.5 Kommerzielle Kits

Tab. 6 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
<i>DNA Clean &amp; Concentrator™</i>	Zymo Research Europe, Freiburg, D
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
<i>PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
<i>ZR Genomic DNA™-Tissue MiniPrep</i>	Zymo Research Europe, Freiburg, D
<i>Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit</i>	Zymo Research Europe, Freiburg, D
<i>Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Zymo Research Europe, Freiburg, D

## 2.6 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinie und *Toxoplasma gondii*-Stämme

### 2.6.1 Bakterienstämme

Tab. 7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp und Quelle	AB-Res.
OmniMAX2T1	F' [proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD (Invitrogen™)	Tet
PIR1	F- Δlac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMluI)::pir-116 (Invitrogen™)	-
SNF2-Fd-LipA*	wie SNS 126F'+ intergrierte Fusionsproteine Fd und LipA + GentR	Tet, Spec, Kan, Gent
SNF2-Fd-FNR*	wie SNS 126F'+ intergrierte Fusionsproteine Fd und FNR + GentR	Tet, Spec, Kan, Gent
SNF2-Fd-FNR <sub>mut</sub> *	wie SNS 126F'+ intergrierte Fusionsproteine Fd und FNR + GentR	Tet, Spec, Kan, Gent
SNF2-FNR-LipA*	wie SNS 126F' + intergrierte Fusionsproteine FNR und LipA + GentR	Tet, Spec, Kan, Gent
SNS126	BW27786 & ΔhisB + Reporter ( <i>HIS3</i> -KanR- <i>lacZ</i> ): F- DE(araD-araB)567 lacZ4787(del)::rrnB-3) LAM-DE(araH-araF)570(::FRT) araEp-532(del)::FRT φP <sub>cp13</sub> ara E534 DE (rhaD-rhaB)568 rrnB-3 hsdR514 ΔhisB (Horswill <i>et al.</i> 2004)	Tet, Spec, Kan
SNS126F*	wie SNS 126, zusätzlich: F'[lacIq Tn10 (TetR)]	Tet, Spec, Kan
SNS126F'32*	wie SNS 126F' + intergrierte Fusionsproteine mRR1 und mRR2+ AmpR (wie in Horswill <i>et al.</i> 2004)	Tet, Spec, Kan, Amp

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp und Quelle	AB-Res.
Top10F'	F'[lacIqTn10 (TetR)] mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen™)	Tet

\* Bakterienstamm innerhalb dieser Arbeit generiert, siehe 3.2.3 oder 3.2.4

## 2.6.2 Eukaryotische Zelllinie

Als Wirtszelle für die *T. gondii*-Tachyzoiten kamen HFF Zellen (BJ-5ta ATCC® CRL-4001™) zum Einsatz, die über LGC Standards GmbH, Wesel, D bezogen wurden. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine Immortalisierung nach Transfektion mit der humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) aus.

## 2.6.3 *T. gondii*-Stämme

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten *T. gondii*-Stämmen (basierend auf RH-Stämmen, siehe Tab. 8) handelt es sich um Typ I-Stämme.

Tab. 8 *T. gondii* Stämme

<i>T. gondii</i> -Stamm	Genotyp und Quelle
DiCre	RH $\Delta$ HXGPRT $\Delta$ Ku80::DiCre (Andenmatten <i>et al.</i> 2013), Typ I-Stamm, erhalten von M. Meissner (University of Glasgow, UK)
DiCre-265	wie DiCre, Plasmid pG265 genomisch integriert
DiCre-Fd* (DC-ePFd)	wie DiCre, Plasmid pG265-Fd mittels doppelt homologer Rekombination genomisch integriert
DiCre-T8Fd* (DC-Fd)	wie DiCre, Plasmid pG265-T8Fd mittels doppelt homologer Rekombination genomisch integriert
RH $\Delta$ HX $\Delta$ KU	RH $\Delta$ HXGPRT $\Delta$ Ku80 (Fox <i>et al.</i> 2009), Typ I-Stamm, erhalten von D. Soldati-Favre (Université de Genève, Schweiz)
Fd ikd* (7C oder Fd 1.7C)	wie RH $\Delta$ HX $\Delta$ KU, Plasmid piko-Fd mittels doppelt homologer Rekombination genomisch integriert (sehr gutes Ansprechen auf ATc, Fd Knockdown-Stamm)
Fd ikd* (5H oder Fd 1.5H)	wie RH $\Delta$ HX $\Delta$ KU, Plasmid piko-Fd mittels doppelt homologer Rekombination genomisch integriert (kein Ansprechen auf ATc, Kontrollstamm in ausgewählten Versuchen, siehe 4.3.6)
Fd ikd kompl* (7Cc1)	wie Fd ikd, Plasmid pGRA-UPRT-Fd mittels doppelt homologer Rekombination genomisch integriert

\*Parasitenstamm innerhalb dieser Arbeit generiert, siehe 3.3.3

## 2.7 Software und Datenbanken

### 2.7.1 Software

Tab. 9 Software

Software	Hersteller
<i>AxioVision Rel. 4.8.</i>	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, D
<i>Geneious® 7.1.4</i>	Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland
<i>GraphPad Prism 5.04</i>	GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA
<i>i-control 1.10</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<i>ImageJ 1.48v</i>	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; verwendete Macros: <i>Count_Plaques_Toolbox_7</i> (geschrieben von Prof. Seeber) <i>Macro for Blind Analyses</i> ( <a href="http://imagej.1557.x6.nabble.com/Macro-for-Blind-Analyses-td3687632.html">http://imagej.1557.x6.nabble.com/Macro-for-Blind-Analyses-td3687632.html</a> ) <i>NeuronJ</i> (Meijering <i>et al.</i> 2004)
<i>PS Remote</i>	Breeze Systems, Camberley, Surrey, UK
<i>ZEN 2012 (blue edition)</i>	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, D

### 2.7.2 Datenbanken

Tab. 10 Datenbanken

Software	Hersteller
<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST) (Altschul <i>et al.</i> 1990)	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
<i>E. coli</i> Genotypen	<a href="http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes">http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes</a>
<i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI)	Literaturrecherche
New England Biolabs (NEB) – <i>Double Digest Finder</i>	<a href="https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder">https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder</a>
Proteindatenbank ( <i>RCSB protein data bank</i> )	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>
Toxo DB: <i>The Toxoplasma genome resource</i>	<a href="http://www.toxodb.org/toxo/">http://www.toxodb.org/toxo/</a>

### 3. Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung amplifizierter oder restringierter DNA zur Ermittlung der Fragmentgröße. Die entsprechenden Proben wurden 1:10 mit einem DNA-Ladepuffer versetzt und auf das 1-1,8 %ige Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung nach Anlegen einer Spannung von 5-10 V/cm Gellänge in einer horizontalen Gelkammer für ungefähr eine Stunde. Die Auftrennung der DNA-Banden konnte nach einer 30 minütigen Inkubation des Gels in einer *GelGreen*<sup>™</sup>-Färbelösung bei RT bei 470 nm mit Hilfe eines Transilluminators visualisiert werden. *GelGreen*<sup>™</sup> tritt in Wechselwirkung mit der DNA und kann durch sein Absorptionsmaximum bei ~500 nm als grün fluoreszierender Nukleinsäure-Farbstoff detektiert werden. Die Bestimmung der Größe der erhaltenen Banden erfolgte durch den Vergleich mit dem DNA-Größenstandard *GeneRuler*<sup>™</sup> 1 kb Plus DNA Ladder. Sollte nach der Identifikation eines gewünschten DNA-Fragments die Bande durch Herausschneiden isoliert werden, spricht man von einem präparativen Agarosegel. Zur Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde das *Zymoclean*<sup>™</sup> Gel DNA Recovery Kit verwendet und im Anschluss die Konzentration der DNA am *NanoDrop*<sup>®</sup> ND-1000 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

##### 3.1.2 DNA-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe zweier Kits. Zur Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (aus ~4 ml Bakterienkultur) kam das Kit *Zyppy*<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit zur Anwendung, zur Isolierung größerer Mengen DNA (aus ~75 ml Bakterienkultur) das Kit *PureLink*<sup>®</sup> HiPure Plasmid Midiprep Kit *Invitrogen*<sup>™</sup>. Für die Extraktion genomischer DNA aus *T. gondii* wurde das Kit *ZR Genomic DNA*<sup>™</sup> -Tissue MiniPrep verwendet. Die Präparation wurde in allen Fällen nach Herstellerangaben durchgeführt. Isolierte DNA wurde grundsätzlich bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte am *NanoDrop*<sup>®</sup> ND-1000 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.



### 3.1.3 Restriktionsenzymverdau

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben des Enzymherstellers New England Biolabs GmbH unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems. Zur Überprüfung eines Konstruktes wurde ein Verdau mit ~200-300 ng DNA in üblicherweise 10 µl angesetzt. Ein größerer Ansatz wurde benötigt um Vektoren zur Klonierung (5-10 µg DNA, siehe Tab. 15) oder zur Transfektion (50 µg) zu linearisieren, wobei das Volumen zwischen 50-200 µl schwankte. Zur Linearisierung von piko-Fd wurde *SbfI* verwendet, für pGRA-UPRT-Fd *NotI*, für pG265 *SmaI*, für pG265-Fd und pG265-T8Fd *ApaI* (siehe 3.3.3). Alle Restriktionen erfolgten mit ~1 U Enzym pro µg DNA. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde das Puffersystem nach Empfehlungen des Herstellers angepasst (siehe Tab. 9). Die Überprüfung eines erfolgreichen Restriktionsverdaus erfolgte üblicherweise mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung (je nach Zweck analytisch oder präparativ, siehe 3.1.1).

### 3.1.4 PCR – Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, die der Amplifikation und Modifikation von DNA dient (Mullis *et al.* 1986). Gewünschte Restriktionsenzym-Schnittstellen oder -Überhänge können durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide am 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden DANN-Fragmente eingefügt werden. Die Überprüfung einer erfolgreichen PCR erfolgte üblicherweise mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung (je nach Zweck analytisch oder präparativ, siehe 3.1.1) oder der Sequenzierung (siehe 3.1.6). Je nach Anwendung sind unterschiedliche *Taq*-Polymerasen, PCR-Ansätze oder -Programme verwendet worden. Diese sind im Folgenden näher beschrieben. Um mögliche Kontaminationen der verwendeten Bestandteile zu ermitteln, wurde bei jedem Ansatz stets eine Kontrolle mitgeführt, in der sich keine DNA befand.

#### PCR zur Herstellung der Insertions-DNA

Zur Amplifikation einer Insertions-DNA, welches im Weiteren bei einer Klonierung zum Einsatz kommen sollte, wurde standardmäßig die *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich im Gegensatz zu *Taq* DNA-Polymerasen durch eine mindestens 50fach geringere Fehlerrate aus. Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt 1x *Phusion®* Polymerase Puffer (5x), 0,2 mM dNTP's, 1 U *Phusion®* Polymerase, 1-50 ng DNA und je 0,5 mM der Oligonukleotide FW bzw. BW in ddH<sub>2</sub>O. In Tab. 11 ist das bei der Verwendung

der *Phusion*® Polymerase zum Einsatz gekommene PCR-Programm aufgeführt. Die Annealing-Temperaturen ( $T_A$ ) variierten je nach verwendeter Oligonukleotid-Kombination und sind in Tab. 15 aufgeführt. Nach Ablauf der PCR wurden die DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des *Zymoclean*™ *Gel DNA Recovery Kit* nach Herstellerangaben isoliert und standen für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung (siehe 3.1.5).

**Tab. 11 PCR-Programm bei Verwendung der *Phusion*®-Polymerase**

PCR-Zyklen	Temp [°C]	Zeit [s]	Bezeichnung
1	98	30	Denaturierung
	98	10	Denaturierung
30	variabel (siehe Tab. 15)	30	Annealing
	72	15/kb	Extension
1	72	300	finale Extension

### Analytische PCR

Die analytische PCR wurde verwendet, um das Vorhandensein bestimmter DNA-Abschnitte in einer DNA-Matrize zu überprüfen. Dabei kann es sich um den Nachweis einer Insertion in ein Plasmid nach einer Klonierung handeln oder auch um die Integration von Genabschnitten in ein Genom. Standardmäßig wurde dafür die *Mango Taq*™ Polymerase verwendet, wobei ein 20 µl PCR-Ansatz 1x *Mango Taq*™ Puffer (5x), 0,25 mM dNTP's, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1,25 U *Mango Taq*™ Polymerase, 1-50 ng DNA und je 0,5 mM der Oligonukleotide FW bzw. BW in ddH<sub>2</sub>O enthielt. Falls im Folgenden nicht anders beschrieben kam das in Tab. 12 genannte PCR-Programm zur Anwendung. Zur Überprüfung der korrekten Integration der Fusionsprotein-Konstrukte in den *E. coli*-Stamm SNS126F' (RTHS-Stämme: SNS126F'32, SNF2-Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR, SNF2-Fd-FNR*mut*, SNF2-FNR-LipA) wurden die Oligonukleotide 52, 53, 54 und 55 (Tab. 26) wie bei Haldimann und Wanner 2001 beschrieben mit einer  $T_A$  von 59 °C eingesetzt.

**Tab. 12 PCR-Programm bei Verwendung der *Mango Taq*™ Polymerase**

PCR-Zyklen	Temp [°C]	Zeit [s]	Bezeichnung
1	96	300	Denaturierung
	96	30	Denaturierung
30	variabel (siehe Tab. 14)	30	Annealing
	72	15-30/kb	Extension
1	72	300	finale Extension

Um die korrekte Integration des Knockdown- (piko-Fd) bzw. des konditionalen Knockout-Konstruktes (pG265-Fd, pG265-T8Fd) in die entsprechenden *T. gondii*-Stämme nachzuweisen sind in Tab. 13 die Oligonukleotid-Kombinationen und die dazugehörigen Annealing-Temperaturen ( $T_A$ ) aufgeführt. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm entsprechen denen im Absatz Analytische PCR beschriebenen (siehe 3.1.4). Abweichungen in der Extensionszeit ( $t_E$ ) und gegebenenfalls in der Anzahl der PCR-Zyklen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

**Tab. 13** Auflistung der verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration eines Konstruktes in *T. gondii* sowie die dabei verwendete  $T_A$ ,  $t_E$  und Zyklenanzahl.

<i>T. gondii</i> -Stämme	Kombination	ON (Tab. 26)	$T_A$ [°C]	$t_E$ [s]	Zyklen
parental	1	63, 70	60	50	30
RHΔHXΔKU,	2	72, 77	60	50	30
Fd ikd	3	71, 78	60	50	30
	1	66, 68	50	30	3
			55	30	3
			60	30	24
parental DiCre,	2	42, 44	60	90	30
DiCre-Fd,	3	43, 71	50	30	3
DiCre-T8Fd			55	30	3
			60	30	24
	4	39, 66	50	60	3
			55	60	3
			60	60	24

### Kolonie PCR

Die Identifizierung erfolgreich klonierter rekombinanter Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Stämmen erfolgte mit Hilfe einer Kolonie-PCR, die auf der Verwendung intakter Zellen als DNA-Template basiert. Dazu wurde Bakterienzellmaterial einer Kolonie mit einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl PCR-Ansatz (siehe oben „Analytische PCR“, ohne DNA-Zusatz) überführt und durch auf- und abpipettieren suspendiert. Die verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen zur Überprüfung des jeweils erfolgreich klonierten Plasmids können Tab. 14 entnommen werden. Das in Tab. 12 beschriebene PCR-Programm wurde mit den in Tab. 14 genannten  $T_A$  angewandt. Zur Bestimmung der erfolgreichen Exzision von Fd nach Transformation der Plasmide pG265-Fd und pG265-T8Fd in einen Cre-Rekombinase exprimierenden *E. coli*-Stamm (*StrataClone SoloPack Competent Cells*, Agilent Technologies, Inc, CA, USA) kam ebenfalls eine Kolonie

PCR zum Einsatz, bei der die ON 38 und 39 sowie eine  $T_A$  von 58 °C verwendet wurden (durchgeführt von Steffen Zander, FG16, Robert Koch-Institut).

**Tab. 14 Oligonukleotid-Kombinationen zur Identifizierung erfolgreich klonierter Plasmide in der Kolonie-PCR sowie die dabei verwendete  $T_A$**

Plasmid	ON (Tab. 26)	$T_A$ [°C]	Plasmid	ON (Tab. 26)	$T_A$ [°C]
pNF1	57, 58	55	piko-1x-1/2	14, 59	60
pNF1-Fd	45, 73	60	piko-1x	17, 62 und 16, 61	57
pNF1-LipA	6, 46	55	piko1x-3UTR	18, 61	57
pNF1-Fd-LipA	45, 73 und 5, 6	60	piko1x-3/5UTR	59, 60	58
pNF1-FNR-LipA	45, 73	55	piko-Fd	74, 75	56
pNF2	11, 45	56	pGRA-UPRT-Fd	68, 69	60
pNF2-Fd-LipA	6, 58	56	pG265-5UTRFd	72, 77	55
pNF2-Fd-FNR	57, 78	56	pG265-T8Fd	40, 47	55
pNF2-Fd-FNR <sub>mut</sub>	57, 78	56	pG265-Fd	68, 69 und 48, 51	55
pNF2-FNR-LipA	6, 58	56			

### 3.1.5 Klonierung

Es stehen vielfältige Methoden zur Verfügung, um Plasmide zu generieren. In dieser Arbeit sind neben der klassischen Klonierungsvariante, dem Ligieren von DNA-Fragmenten nach Restriktionsenzymverdau, zwei weitere Methoden zum Einsatz gekommen: das *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) und das *Sequence and Ligation Independent Cloning* (SLIC). Beide Varianten basieren auf überlappenden Überhängen der Vektor- und Insertions-DNA ohne Verwendung einer Ligase. Sie werden im Folgenden näher beschrieben. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit klonierten Plasmide ist in Tab. 15 gegeben. Dort werden für jedes generierte Plasmid der Ausgangsvektor sowie der Ursprung der Insertions-DNA genannt. Des Weiteren wird die Methode genannt, mit der das Plasmid kloniert wurde. Die Plasmidkarten ausgewählter Plasmiden (**fett** markiert) befinden sich im Anhang (siehe 7.4). Sämtliche Fusionsprotein-Plasmide pNF1 und pNF2 basieren auf den sogenannten CRIM-Plasmiden (siehe auch 3.2.4), die den  $\gamma$ -Replikationsursprung R6K besitzen und daher das  $\Pi$ -Protein (kodiert durch *pir*) zur Replikation benötigen (Haldimann und Wanner 2001). Für diese Konstrukte wurden entsprechend PIR1-Zellen verwendet (siehe Tab. 7). Alle anderen Plasmide wurden in OmniMAX2T1 transformiert.

Tab. 15 Übersicht sämtlicher generierter Plasmide unter Angabe der Klonierungsstrategie (Plasmidkarten fett-markierter Plasmide siehe 7.4)

Plasmid	Vektor	RE-Verdau	Insertions-DNA	ON (Tab. 26)	T <sub>A</sub> [°C]	Methode
pNF1	pAH152	<i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I	Fusionsproteine P22 und 434 aus <b>pTHCP14</b> (RE-Verdau: <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I)	-	-	Ligation
pNF1-Fd	pNF1	<i>Spe</i> I	<i>Tg</i> Fd (cDNA) aus pET28b-TgFd	1, 2	55	CPEC
pNF1-LipA	pNF1	<i>Bam</i> HI	<i>Tg</i> LipA aus pS1-TgLipA	5, 6	55	CPEC
pNF1-Fd-LipA	pNF1-Fd	<i>Bam</i> HI	<i>Tg</i> LipA aus pS1-TgLipA	5, 6	55	CPEC
pNF1-Fd-FNR	pNF1-Fd	<i>Bam</i> HI	<i>Tg</i> FNR aus pET28b-TgFNR ( <i>Bsm</i> BI-Verdau => <i>Bam</i> HI-Überhang)	7, 8	-	Ligation
pNF1-Fd-FNRmut	pNF1-Fd	<i>Bam</i> HI	<i>Tg</i> FNR aus pB42AD-FNRmut	3, 4	55	CPEC
pNF1-FNR-LipA	pNF1-LipA	<i>Spe</i> I	<i>Tg</i> FNR aus pS1-TgFNR ( <i>Bsm</i> BI-Verdau => <i>Spe</i> I-Überhang)	9, 10	-	Ligation
pNF2	pNF1	<i>Pvu</i> II, <i>Nde</i> I	P <sub>Tac</sub> aus <b>pTHCP14</b>	11, 12	56	CPEC
pNF2-Fd-LipA	pNF1	<i>Pvu</i> II, <i>Bam</i> HI	P <sub>Tac</sub> aus <b>pTHCP14</b>	11, 12	56	CPEC
pNF2-Fd-FNR	pNF1	<i>Pvu</i> II, <i>Bam</i> HI	P22-Fd-434-LipA aus pNF1-Fd-LipA	13, 6	59	CPEC
pNF2-Fd-FNRmut	pNF1	<i>Pvu</i> II, <i>Bam</i> HI	P <sub>Tac</sub> aus <b>pTHCP14</b>	11, 12	56	CPEC
pNF2-FNR-LipA	pNF1	<i>Pvu</i> II, <i>Bam</i> HI	P22-Fd-434-FNR aus pNF1-Fd-FNR	13, 4	59	CPEC
pG265-5UTRFd	pG265	<i>Psp</i> OMI, <i>Pac</i> I	<i>Tg</i> Fd-Myc aus piko-Fd P <sub>Tub8</sub> aus pG265 <i>Psp</i> OMI, <i>Pac</i> I	26, 27	60	SLIC
pG265-T8Fd	pG265-5UTRFd	<i>Eco</i> RV	Fd-5'UTR aus Cosmid PSBM821	28, 29	58	
pG265-Fd	pG265-T8Fd	<i>Nco</i> I, <i>Bst</i> BI	Fd-3'UTR aus Cosmid PSBM821 P <sub>Fd</sub> endogen aus Cosmid PSBM821	30, 31	58	
				32, 33	58	SLIC
				34, 35	62	SLIC

Tab. 15 Fortsetzung: Übersicht sämtlicher generierter Plasmide unter Angabe der Klonierungsstrategie (Plasmidkarten fett-markierter Plasmide siehe 7.4)

Plasmid	Vektor	RE-Verdau	Insertions-DNA	ON (Tab. 26)	T <sub>A</sub> [°C]	Methode
piko-1x-1/2	piko-COR	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>	loxP Downstream von <i>TgFd</i> aus <b>pG265-T8Fd</b>	36, 37	62	
<b>piko-1x</b>	piko-1x-1/2	<i>Bgl/II</i> , <i>SpeI</i>	RE-Schnittstellen <i>SbfI</i> , <i>SwaI</i>	14, 15	-	Ligation
piko1x-3UTR	<b>piko-1x</b>	<i>PmeI</i>	RE-Schnittstelle <i>PmeI</i>	16, 17	-	Ligation
piko1x-3/5UTR	piko1x-3UTR	<i>SwaI</i>	Fd-3'UTR aus genomischer DNA von RHΔHXΔKU	18, 19	55	CPEC
<b>piko-Fd</b>	piko1x-3/5UTR	<i>EcoRV</i>	Fd-5'UTR aus Cosmid PSBM821	20, 21	55	CPEC
<b>pGRA-UPRT-Fd</b>	pGRA-GFP-UPRT	<i>SmaI</i>	<i>TgFd</i> aus Cosmid PSBM821	22, 23	60	CPEC
			P <sub>Fd</sub> endogen + <i>TgFd</i> aus Cosmid PSBM821	24, 25	66	SLIC

### Klassische Ligation

Die Verknüpfung zweier restringierter DNA-Fragmente mit überhängenden komplementären Enden (*sticky ends*) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U) in 2 µl des vom Hersteller angegebenen Puffersystems (10x Puffer) und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Für eine Ligation wurden Insertions- und Vektor-DNA einer erfolgreichen Restriktion in einem molaren Verhältnis von 3:1 verwendet. Der Ligationsansatz wurde 2-4 h bei 22 °C oder üN bei 16 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation des Ansatzes, bei der zudem ein Kontrollansatz transformiert wurde, der keine Insertions-DNA enthielt. Anhand dessen wurde nach Transformation die Anzahl derjenigen Kolonien ermittelt, die unzureichend restringierte Vektor-DNA, also noch zirkuläre Plasmid-DNA, enthalten, was bei den gewählten Selektionsbedingungen das Wachstum von Kolonien ermöglicht.

### CPEC - *Circular Polymerase Extension Cloning*

Das *circular polymerase extension cloning* (CPEC) stellt eine Klonierungsmethode dar, bei der eine Polymerase doppelsträngige und überlappende Insertions- und Vektor-DNA verlängert und so ein neues Plasmid entsteht, ohne dass eine Ligase benötigt wird (Quan und Tian 2009). Die überlappenden Enden haben je gemeinsame Bereiche gleicher Sequenz, die nach Denaturierung und Annealing hybridisieren und durch die *Phusion*® Polymerase zu einem kompletten doppelsträngigen Plasmid verlängert werden, wobei Insertions- und Vektor-DNA jeweils als Matrize verwendet werden. Dazu wurde die Insertions-DNA zunächst mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion synthetisiert (siehe 3.1.4, PCR zur Herstellung der Insertions-DNA) und die Vektor-DNA durch einen Restriktionsenzymverdau linearisiert (siehe Tab. 15). CPEC-Oligonukleotide wurden so entwickelt, dass sie stets einen Überhang zur Vektor- bzw. Insertions-DNA mit einer  $T_m$  von 60 °C haben. Nach entsprechender Reinigung der Fragmente wurden diese in einer Extensions-PCR kombiniert (siehe Tab. 16 und Tab. 17) und im Anschluss die Hälfte des Ansatzes transformiert (siehe 3.2.2). Wie bei der klassischen Ligation beschrieben, wurde stets ein Kontrollansatz ohne Insertions-DNA mitgeführt. Erhaltene Kolonien wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR ihre Korrektheit untersucht (Tab. 14).

**Tab. 16 Ansatz der Extensions-PCR (CPEC)**

Bestandteil	finale Konzentration (20 µl-Ansatz)
<i>Phusion</i> ® Polymerase Puffer (5x)	1x
dNTP's	0,25 mM
<i>Phusion</i> ® Polymerase	0,4 U
Vektor-DNA	100-200 ng
Insertions-DNA 1	molares Verhältnis Vektor:Insert 1:2
(ggf. Insertions-DNA 2)	molares Verhältnis Vektor:Insert 1:2
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tab. 17 Parameter der Extensions-PCR (CPEC)**

Anzahl	Temp [°C]	Zeit [s]	Bezeichnung
1	98	30	Denaturierung
	98	10	Denaturierung
5	55	30	Annealing
	72	30	Extension
1	72	300	finale Extension

### **SLIC – *Sequence and Ligation Independent Cloning***

Das *Sequence and Ligation Independent Cloning* (SLIC) basiert auf einer 3'→5' Exonuklease Aktivität der T4-DNA Polymerase, die bei den gewünschten Insertions-Fragmenten sowie der restringierten Vektor-DNA einzelsträngige Überhänge generiert (Li und Elledge 2007). Das Zusammenfügen der Fragmente findet dann *in vitro* RecA-vermittelt durch homologe Rekombination und Einzelstrang-Annealing statt, welches in rekombinanter Plasmid-DNA resultiert. Die gewünschten DNA-Abschnitte der Insertion wurden mittels einer PCR amplifiziert (siehe 3.1.4, PCR zur Herstellung der Insertions-DNA), wobei Oligonukleotide mit einem 20 bp-Überhang zum Einsatz kamen, der homolog mit der entsprechenden Sequenz des Vektors bzw. einer weiteren Insertions-DNA war. Die Vektor-DNA wurde mit Hilfe eines Restriktionsenzymverdaus linearisiert (siehe 3.1.3). Zunächst wurde jedes der Fragmente mit der T4-DNA Polymerase bei 22 °C für 30 min behandelt (siehe Tab. 18), gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl einer 10 mM dCTP-Lösung und der Inaktivierung bei 75 °C für 20 min. Nach Kombination der Fragmente (siehe Tab. 18 und Tab. 19) fand das Annealing während einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C statt, bevor die Hälfte des Ansatzes transformiert wurde.



**Tab. 18 T4-DNA Polymerase Behandlung der einzelnen Fragmente (SLIC)**

Bestandteil	finale Konzentration (20 µl-Ansatz)
NEB Puffer 2 (10x)	1x
BSA	100 µg/ml
DNA (Vektor oder Insert)	150-300 ng
T4-DNA Polymerase	0,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tab. 19 RecA Ansatz der T4-DNA-Polymerase behandelten Fragmente (SLIC)**

Bestandteil	finale Konzentration (20 µl-Ansatz)
T4-DNA Polymerase behandeltes Insert 1	1:1 molares Verhältnis zu Vektor
(ggf. T4-DNA Polymerase behandeltes Insert 2; 3...)	1:1 molares Verhältnis zu Vektor
T4-DNA Polymerase behandelter Vektor	3 ng
T4-DNA Ligase Puffer (10x)	1x
RecA	20 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### 3.1.6 Sequenzierung

Generierte Plasmid-DNA oder auch PCR-Produkte (vorherige Reinigung mit Hilfe des Kits *DNA Clean & Concentrator*<sup>TM</sup>) wurden durch eine Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Dabei kam das *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* zur Anwendung, welches auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* 1977 basiert. Nach Durchführung einer PCR-Reaktion der zu sequenzierenden DNA mit jeweils einem Oligonukleotid wurde die Sequenzierung im Haus als Auftragsarbeit durchgeführt. Ein 10 µl Sequenzierungsansatz enthielt 1x Abi-Puffer (5x), 1 µl *BigDye 3.1*, 200 ng DNA und 0,5 mM des Oligonukleotids in ddH<sub>2</sub>O. Das genutzte PCR-Programm ist in Tab. 20 aufgeführt; die eingesetzten Oligonukleotide zur Sequenzierung der jeweiligen Plasmiden sind in Tab. 21 gelistet. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des Programmes *Geneious*<sup>®</sup> 7.1.4 ausgewertet.

**Tab. 20 Programm der Sequenzierungs-PCR**

Anzahl	Temp [°C]	Zeit [s]	Bezeichnung
1	96	120	Denaturierung
	96	10	Denaturierung
25	variabel (siehe Tab. 21)	5	Annealing
	60	240	Extension

**Tab. 21 Oligonukleotid-Kombinationen zur Identifizierung erfolgreich klonierter Plasmide in der Sequenzierungs-PCR sowie die dabei verwendete  $T_A$** 

Plasmid	ON (Tab. 26)	$T_A$ [°C]
pNF1	57, 58	55
pNF1-Fd	45, 73	57
pNF1-LipA	5, 6, 46, 57, 73	55
pNF1-Fd-LipA	1, 2, 5, 6, 45, 46, 57, 73	57
pNF1-FNR-LipA	45, 73	55
pNF2	11, 45, 57	57
pNF2-Fd-LipA	1, 2, 6, 50, 57, 78, 80	57
pNF2-Fd-FNR	2, 50, 57, 78, 79	57
pNF2-Fd-FNR <sub>mut</sub>	2, 50, 57, 78, 79	57
pNF2-FNR-LipA	6, 10, 11, 12, 45, 47, 50, 57, 79, 80	57
piko-1x-1/2	59, 60	57
piko-1x	61, 62	57
piko1x-3UTR	18, 19, 61, 62	57
piko1x-3/5UTR	20, 21, 59, 60	57
piko-Fd	1, 2, 68, 69	57
pGRA-UPRT-Fd	24, 25, 64, 65, 66, 69, 75	55
pG265-5UTRFd	38, 41, 48, 49, 66, 67, 68, 69, 72, 75	55
pG265-T8Fd	32, 33, 47	55
pG265-Fd	39, 48, 51, 66, 68, 69	55

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Einfrieren von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht der unterschiedlichen *E. coli*-Stämme (siehe Tab. 7) erfolgte bei 37 °C und 250 rpm in LB-Medium (Flüssigkultur) oder auf LB-Agarplatten mit Zusatz der entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 7) in den Konzentrationen wie sie in Tab. 3 angegeben sind. Für die dauerhafte Lagerung der Stämme wurden 900 µl einer üN-Flüssigkultur mit 100 µl Hogness-Einfriermedium versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Zur Amplifikation generierter Plasmide bzw. zum Wiedereinbringen von bereits vorhandener Plasmid-DNA in Bakterien wurde eine Transformation durchgeführt. Damit Bakterien externe (Plasmid-)DNA aufnehmen können, müssen sie in einen Status der Kompetenz überführt werden. Dies kann durch eine entsprechende Vorbehandlung und einer anschließenden Hitzeschock-Transformation oder Elektroporation der Bakterienzellen geschehen.

#### Chemokompetente Zellen und Hitzeschock-Transformation

Bei der Hitzeschock-Transformation wird die Bildung von Poren in der Zellmembran chemokompetenter Bakterienzellen durch einen Hitzeschock ausgelöst, wodurch die DNA die Membran passieren kann und somit in die Zelle gelangt. Entsprechend dem Protokoll von Inoue *et al.* 1990 wurde eine Kolonie des *E. coli*-Stammes OmniMAX2T1 oder PIR1 in eine 25 ml SOB-Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotikum (AB, siehe Tab. 7) transferiert und bei 37 °C und 250 rpm für 6-8 h in einem Schüttelinkubator inkubiert. Mit 1, 2 bzw. 5 ml dieser Kultur wurden drei mit jeweils 125 ml LB-Medium (+AB) gefüllten 1 L-Kolben angeimpft. Die sich anschließende üN-Inkubation bei 18 °C, ebenfalls in einem Schüttelinkubator, endete, nachdem eine der drei angesetzten Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,55 erreicht hatte. Die entsprechende Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt bevor die Zellen bei 4°C für 10 min bei 2500 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 40 ml eiskaltem Inoue-Transformationspuffer resuspendiert, die dann wie zuvor zentrifugiert wurden. Der Puffer wurde abgesogen, das entstandene Pellet erneut in 10 ml eiskaltem Inoue-Transformationspuffer aufgenommen, mit 750 µl DMSO versetzt und nach dem Mischen erneut 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zügig als 200 µl-Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und nach dem Verschließen in flüssigen Stickstoff gegeben. Die so hergestellten kompetenten Zellen konnten nun

entweder unmittelbar oder nach der Lagerung bei -70 °C verwendet werden. Geringere Mengen an kompetenten Zellen wurden durch Reduktion der Startkultur und sämtlicher im Ablauf benötigter Lösungen hergestellt.

Für die Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 10-50 ng Plasmid-DNA oder mit einer bestimmten Menge Klonierungsansatzes, wie in 3.1.5 beschrieben, versetzt und für 30 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss fand der Hitzeschock der Mischung für 90 s bei 42 °C im Wasserbad statt. Nach Inkubation des Transformationsansatzes für zwei Minuten auf Eis erfolgte die Regeneration der Zellen ohne Selektion durch Zugabe von 800 µl vorgewärmten SOC-Medium für 60 min in einem Rotationsschüttler (20 rpm) bei 37 °C. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten (+AB) ausplattiert und 16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Identifikation der rekombinanten Bakterienkolonien nach Transformation eines Klonierungsansatzes wurde eine Kolonie-PCR, wie in 3.1.4 beschrieben, durchgeführt. Nach Transformation einfacher Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm eingefroren (siehe 3.2.1) oder die Plasmid-DNA gewonnen (3.1.2). Als Kontrolle wurde stets ein Aliquot kompetenter Zellen ohne Zugabe von zu transformierender DNA mitgeführt. Nach gleicher Durchführung des Protokolls wurden diese Zellen auf LB-Agarplatten mit derselben Antibiotika-Kombination bzw. ohne Antibiotika-Zusatz ausplattiert, um zum einen den Effekt der eingesetzten Antibiotika-Lösungen zu testen und zum anderen die Vitalität der Bakterien zu überprüfen. Nach der Herstellung der kompetenten Zellen hat stets eine Bestimmung der Transformationseffizienz stattgefunden. Dazu wurden 5 ng pUC19 Plasmid-DNA transformiert, 1:10-Verdünnungen der transformierten Zellsuspension ausplattiert und die Kolonien einer geeigneten Verdünnung ausgezählt. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Transformanten pro } \mu\text{g DNA} = \frac{\text{Kolonien} \times \text{totales V } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes V } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}}$$

### **Elektrokompetente Zellen und Elektroporation**

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen fand in kleinem Maßstab für Bakterienstämme, die einmalig mit einem Plasmid transformiert werden sollten, nach dem Protokoll wie in Zhou *et al.* 2004 beschrieben statt. Dazu wurde eine Kolonie einer frisch ausgestrichen Kultur einer LB-Agarplatte des gewünschten Bakterienstammes in 1 ml LB-Medium transferiert und bei 37 °C für ungefähr 2 h bei 250 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Starterkultur wurden weitere 3 ml LB-Medium angeimpft und ebenfalls bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 2 min auf Eis gekühlt und die

Zellen anschließend 1 min bei 2000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml eiskalter 10 %iger Glycerol (v/v)-Lösung für 30 s bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Dies wurde zwei weitere Male wiederholt. Das Zellpellet wurde schließlich in 50 µl Glycerol aufgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Kurz vor der Elektroporation wurde zu der Zellsuspension 10-50 ng Plasmid-DNA gegeben, welche dann in die vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) transferiert wurde. Die Elektroporation fand mit Hilfe des *Biorad XCell Pulsers* statt, bei dem ein elektrischer Puls an die Küvette angelegt wurde. Unmittelbar nach dem Puls wurden 500 µl SOC-Medium (ohne AB) zu der Suspension gegeben und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, welches zur Regeneration der Zellen für 60 min in einem Rotationsschüttler (20 rpm) bei 37 °C inkubiert wurde. Eine Kontrolle ohne Plasmid-DNA Zugabe wurde wie bei der Hitzeschock-Transformation (s.o.) beschrieben mitgeführt.

### 3.2.3 F'-Transfer durch Konjugation

Um eine Phageninfektion des Reporterstammes SNS126 durchführen zu können, wurde das F'-Plasmid des *E. coli*-Stammes Top10F' durch Konjugation auf SNS126 übertragen. So würde zu einem späteren Zeitpunkt die Integration einer zyklischen Peptid-Bank durch Phageninfektion des Reporterstammes SNS126F' möglich sein. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll von Whipple 1998. Von einer 3 ml üN-Kultur der *E. coli*-Stämme SNS126 (SpecR) und Top10F' (TetR) in LB-Medium wurden 0,2 ml der Kulturen in jeweils 4 ml einer LB-Kultur ohne AB transferiert und für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Um den Abbruch der FPili der Top10F'-Bakterienzellen zu verhindern wurde während der letzten 20 min lediglich der Bakterienstamm SNS126 in einem Rotationsschüttler (20 rpm) ebenfalls bei 37 °C wachsen gelassen. Im Anschluss wurden von beiden Stämmen jeweils 0,5 ml in ein gemeinsames Kulturröhrchen überführt, weitere 60 min im Wasserbad, 30 min langsam im Rotationschüttler (25 rpm) und schließlich 60 min bei normaler Geschwindigkeit (250 rpm) im Schüttelinkubator inkubiert (alles bei 37 °C). Auf LB-Agarplatten (Tet/Spec) wurden 100 µl der Bakteriensuspension unverdünnt sowie eine 1:10- und 1:100-Verdünnung ausgestrichen. Als Kontrolle wurden 100 µl der jeweiligen Vorkulturen von Top10F' und SNS126 ebenfalls auf LB-Agarplatten (Tet/Spec) ausplattiert. Vereinzelte Kolonien wurden nach der üN-Inkubation bei 37 °C im Brutschrank isoliert und erneut auf LB-Agarplatten (Tet/Spec) vereinzelt.

### 3.2.4 Genomische Integration der Fusionsprotein-Plasmide

Die Vektoren, der wie in 3.1.5 beschriebenen klonierten Fusionsprotein-Plasmide pNF2-Fd-LipA und pNF2-FNR-LipA sowie pTHCP32, gehören zu den sogenannten CRIM-Plasmiden (*conditional-replication, integration and modular plasmids*, siehe auch 3.1.5), welche eine *phage attachment* (attP) Stelle besitzen. Diese Stelle ermöglicht eine einfache Integration der Plasmide in entsprechende Bakterienstämme mit einer *bacterial attachment* (attB) Stelle mit Hilfe einer Phagen-Integrase (hier: HK022) eines Helferplasmids (Haldimann und Wanner 2001). Der folgende Ablauf wurde wie bei Zhou *et al.* 2004 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Temperatur-sensitive Helferplasmid pAH69 in den Reporterstamm SNS126F' transformiert. Die Zellen wurden in einem kleinen Ansatz elektrokompent gemacht (siehe 3.2.2), wobei die Zellen nach der Transformation lediglich bei 30 °C inkubiert wurden. Der nun mit dem Helferplasmid pAH69 ausgestattete Reporterstamm SNS126F' wurde ebenfalls, wie in 3.2.2 beschrieben - mit Ausnahme der geringeren Temperatur (30 °C) -, elektrokompent gemacht. Nach der Transformation der Plasmide (pNF2-Fd-LipA, pNF2-FNR-LipA, pTHCP32) wurde das Kulturröhrchen bei 42 °C für 30 min, im Anschluss für 11,5 h bei 37 °C und schließlich üN nach dem Ausplattieren der entsprechenden Ansätze auf LB-Agarplatten (+AB, siehe Tab. 7) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung des Verlusts des Helferplasmids pAH69 (AmpR) wurden die erhaltenen Klone auf LB-Agarplatten (+AB) mit und ohne zusätzlichem Amp ausgestrichen. Die so bestätigten Klone wurden mittels einer PCR getestet, ob und in welcher Anzahl sie den gewünschten Abschnitt integriert haben. Die Vorbereitung der Klone erfolgte, wie in 3.1.4 im Abschnitt „Kolonie-PCR“ beschrieben; die verwendeten Oligonukleotide sind im selben Kapitel im Abschnitt „Analytische PCR“ genannt.

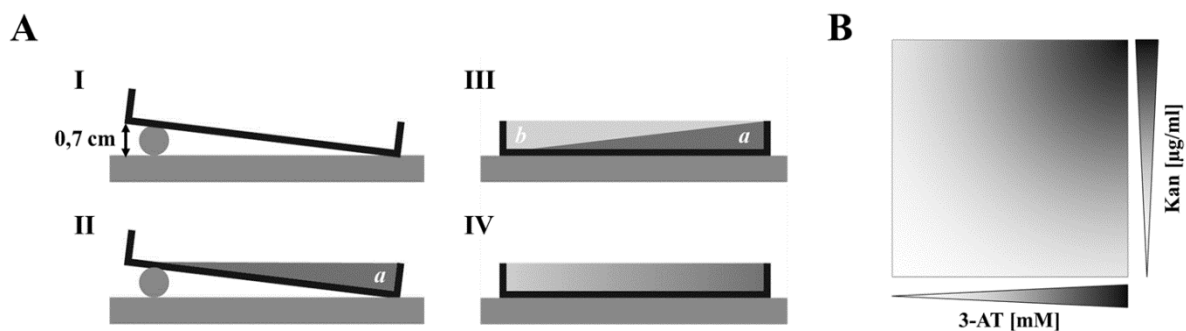
### 3.2.5 Kinetischer $\beta$ -Galaktosidase Assay

Aufgrund des in der Reporterkassette der RTHS-Stämme integrierten *lacZ*-Gens, kann eine quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Gal-Aktivität der Stämme im induzierten (IPTG) bzw. nicht-induzierten Zustand ermittelt werden. Der Assay beruht auf einer durch die  $\beta$ -Gal-Aktivität hervorgerufenen Spaltung des farblosen Substrats ONPG in Galaktose und gelbes o-Nitrophenol, welches photometrisch bei 415 nm detektiert werden kann. Der folgende Ablauf basiert auf dem Protokoll von Thibodeau *et al.* 2004. Von einer 3 ml üN-Kultur in Minimalmedium (MOPS-Medium)  $\pm$  IPTG 100  $\mu$ M (+AB, siehe Tab. 7) bei 37 °C der RTHS-Stämme (SNF2-Fd-LipA, SNF2-FNR-LipA, SNS126F'32) wurden 150  $\mu$ l oder eine entsprechende Menge mit einer OD<sub>600</sub> von 0,15 (am *Infinite*<sup>®</sup> M200 PRO gemessen)

zu 3 ml frischem MOPS-Medium (+AB;  $\pm$ IPTG) gegeben und erneut  $\bar{u}$ N im Schüttelinkubator bei 37 °C wachsen gelassen. Nach Zentrifugation von 2 ml der  $\bar{u}$ N-Kultur oder entsprechenden Mengen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,14 wurden die Pellets in 100  $\mu$ l MOPS-Medium resuspendiert, mit 11  $\mu$ l Zelllyse-Reagenz (10x) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Von jedem Lysat wurden je 15  $\mu$ l in zwei Kavitäten einer 96-Lochplatte überführt und eine Mischung aus 135  $\mu$ l Z-Puffer (frisch versetzt mit 2,7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol pro ml Z-Puffer) und 30  $\mu$ l einer ONPG-Lösung (4 mg/ml) gegeben. Der Assay wurde über 30 min bei 28 °C am *Infinite*<sup>®</sup> M200 PRO bei 415 nm vermessen und die Miller Units wie in Thibodeau *et al.* 2004 beschrieben berechnet.

### 3.2.6 Optimierung des Selektionsmediums durch Titration von 3-AT und Kanamycin

Durch den Einsatz geeigneter Konzentrationen von Kan und 3-AT ist die Identifikation eines Inhibitors der PPI bei Induktion der RTHS-Stämme möglich (Horswill *et al.* 2004, Einzelheiten siehe 1.2.4). Um einen Eindruck des benötigten Konzentrationsbereichs von 3-AT und Kan bei den RTHS-Stämmen (SNF2-Fd-LipA, SNF2-FNR-LipA, SNS126F'32) zu erhalten, wurden Minimalmedium-Agarplatten (MOPS-Agarplatten) mit einem senkrecht zueinander verlaufenden Gradienten von 3-AT und Kan hergestellt (siehe Abb. 10, Panagou *et al.* 2005). Dazu wurde eine quadratische Petrischale (120 x 120 mm) an einer



**Abb. 10: Schema der Herstellung von Gradientenplatten und der resultierende Gradient**

**A** Die quadratische Petrischale wurde erhöht (0,7 cm, I) und der Kan-enthaltende MOPS-Agar (a) in die Platte gegossen (II). Nach dem Aushärten wird die Petrischale eben gestellt und mit MOPS-Agar ohne weitere Zusätze (b) bis gerade eine plane Oberfläche entstanden ist aufgefüllt (III). Diese Prozedur (I-III) wird senkrecht zum ersten Gradienten mit 3-AT-haltigem MOPS-Agar wiederholt. Nach zweitägiger Inkubation sind die Wirkstoffe diffundiert (IV), so dass zwei senkrecht zueinander verlaufende Gradienten entstanden sind. **B** Schema des Verlaufs der Gradienten von 3-AT und Kan. In einer Ecke (schwarz) sind beide Stoffe in ihrer höchsten Konzentration vorhanden, in der gegenüberliegenden Ecke (weiß) befindet die niedrigste Konzentration. Dazwischen verläuft der Gradient. (Schema A verändert entnommen von Luo *et al.* 2010)

Seite erhöht aufgestellt (0,7 cm) und mit Kan-haltigem MOPS-Agar befüllt (Abb. 10A, I-II, siehe Tab. 22). Nach dem Aushärten wurde die Petrischale eben hingestellt und mit MOPS-Agar ohne weitere Zusätze (siehe Tab. 22) aufgefüllt (siehe Abb. 10A, III). Dieser Vorgang wurde senkrecht zu dem Kan-Gradienten mit 3-AT-haltigem MOPS-Agar wiederholt. Für jeden RTHS-Stamm wurde so je eine Platte mit und ohne IPTG-Zusatz (100  $\mu$ M) hergestellt. Die Gradientenplatten wurden vor der Benutzung stets 48 h gelagert, um eine ausreichende Diffusion der Inhaltsstoffe zu gewährleisten (Luo *et al.* 2010). Von einer 1 ml  $\bar{u}$ N-Kultur in MOPS-Medium  $\pm$ IPTG 100  $\mu$ M (+AB, siehe Tab. 22) bei 37 °C der RTHS-Stämme wurden 200  $\mu$ l zu 3 ml frischem MOPS-Medium (+AB;  $\pm$ IPTG) gegeben und erneut  $\bar{u}$ N im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Es wurden 0,5 ml einer  $10^{-5}$ -Verdünnung der  $\bar{u}$ N-Kulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,07 (gemessen am *Infinite® M200 PRO*) auf die Gradientenplatten gleichmäßig verteilt und 72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bakterienkolonien auf den Agarplatten wurden durch die Zugabe von 0,01 % TTC sichtbar, welches metabolisch aktive Zellen durch die Bildung des roten Farbstoffes Formazan anfärbt (Kuhn und Jerchel 1941, Fred und Knight 1949).

Um die optimalen Screeningbedingungen für die Selektion der RTHS-Stämme zu bestimmen, wurden nach der Ermittlung des ungefähren Konzentrationsbereichs von 3-AT und Kan MOPS-Agarplatten  $\pm$ IPTG 100  $\mu$ M (+AB, siehe Tab. 22) mit verschiedenen 3-AT- sowie Kan-Konzentrationen hergestellt. Die Vorbereitung der Kulturen der RTHS-Stämme erfolgte wie oben beschrieben. Eine Verdünnungsreihe ( $1 \cdot 10^{-1}$  -  $1 \cdot 10^{-5}$ ) der  $\bar{u}$ N-Kulturen in MOPS-Medium beginnend mit einer OD<sub>600</sub> von 0,07 (gemessen am *Infinite® M200 PRO*) wurde hergestellt und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 10  $\mu$ l der Verdünnungen auf die jeweiligen MOPS-Agarplatten aufgetragen. Als Kontrolle für die Vitalität der Bakterienzellen wurde stets eine MOPS-Agarplatte ohne weitere Zusätze (außer die in Tab. 22 genannten AB) angefertigt. Die Platten wurden für 72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

**Tab. 22 Übersicht über die Antibiotika sowie 3-AT bzw. Kan-Konzentrationen in MOPS-Agarplatten**

RTHS-Stamm	Antibiotika	Gradientenplatten	
		höchste 3-AT-Konz [mM]	höchste Kan-Konz [ $\mu$ g/ml]
SNF2-Fd-LipA	Tet/Spec/Gent	25	200
SNF2-FNR-LipA	Tet/Spec/Gent	25	200
SNS126F'32	Tet/Spec/Amp	15	100



### 3.3 Zellkulturmethoden

#### 3.3.1 Kultivierung der eukaryotischen Wirtszelllinie

Die adhärent wachsenden HFF Zellen (humane Vorhaut Fibroblasten, BJ-5ta ATCC® CRL-4001™) wurden in DMEM (2 % oder 10 % FKS, siehe Tab. 1) unter 5 % CO<sub>2</sub> und bei 37 °C kultiviert. Das Subkultivieren der Zellen fand nach Erreichen der Konfluenz statt. Dazu wurde das in den Zellkulturflaschen (T75) enthaltene Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Trypsinieren der Zellen wurde 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (1x) auf den Rasen verteilt, gefolgt von einer ~5 minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Nach dem Ablösen der Zellen wurden erneut 10 ml PBS in die Flasche gegeben, die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet mit 5-10 ml DMEM (10 % FKS) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Je nach gewünschter Anwendung wurde die Zellsuspension 1/8 – 1/10 in DMEM (10 % FKS) verdünnt und in T25/75-Zellkulturflaschen oder 12/24/96-Lochplatten verteilt. Sollte eine 24-Lochplatte für einen IFA vorbereitet werden (3.3.4), wurden die Kavitäten der Platten vor der Medienzugabe mit Ø 10 mm Deckgläschen präpariert.

#### 3.3.2 Kultivierung von *T. gondii* Tachyzoiten

*T. gondii* Tachyzoiten (Stämme siehe Tab. 8) wurden mit HFF-Zellen als Wirtszellen in DMEM (10 % FKS, siehe Tab. 1) unter 5 % CO<sub>2</sub> und bei 37 °C kultiviert. In eine T25-Zellkulturflasche mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag ~0,5 ml einer frisch lysierten Tachyzoiten-Suspension mit einer Pasteurpipette transferiert. Um die *T. gondii* Zellzahl zu bestimmen, wurden grundsätzlich sich kurz vor der Lyse befindliche, infizierte HFF-Zellen verwendet. Dazu wurde der entsprechende Zellrasen einer T25- oder T75-Zellkulturflasche abgeschabt, mit Hilfe einer Spritze durch eine 25 G Hohlneedle in ein 15 oder 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinzelt und im Anschluss bei 100 g für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand in neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 300 g für 10 min zentrifugiert wurde, wurde der Überstand mit einer Glaspipette abgesaugt, das Pellet in 500 µl DMEM (2 % FKS, ggf. Zugabe der jeweiligen Wirkstoffe) aufgenommen und die Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Eine serielle 1:10-Verdünnung ebenfalls in DMEM (2 % FKS, ggf. Zugabe der jeweiligen Wirkstoffe) wurde angefertigt und die Parasiten der 10<sup>-2</sup>- oder 10<sup>-3</sup>-Verdünnung mit Hilfe der C-Chip-

Zählkammer nach Herstellerangaben gezählt. Im Folgenden werden diese Schritte als „zählen“ oder nur als „durch die Spritze vereinzeln“, wenn kein Zählen stattgefunden hat, zusammengefasst.

### 3.3.3 Transfektion von *T. gondii*

Bei der Transfektion von Tachyzoiten mit Plasmid-DNA wird ein fremder DNA-Abschnitt von den Parasiten aufgenommen, so dass transgene *T. gondii*-Stämme entstehen. Das folgend beschriebene Protokoll wurde Stripen und Soldati 2007 entnommen. Demnach wurde bereits einen Tag vor der geplanten Transfektion die Plasmid-DNA durch einen geeigneten Restriktionsenzym-Verdau linearisiert (siehe 3.1.3) und im Anschluss zur Sterilisation der DNA eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Dazu wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung sowie das zweieinhalb-fache Volumen 99,5 % (v/v) Ethanol zu dem Verdau hinzugegeben und für 5 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 21500 g und 4 °C wurde das Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde unter der Sterilbank verworfen und das Pellet ~10 min getrocknet bevor es in 50 µl Cytomix aufgenommen wurde und üN bei 4 °C lagerte. Am Tag der Transfektion wurden die gewünschten Stämme einer T75-Zellkulturflasche gezählt (siehe 3.3.2). Währenddessen wurde die unverdünnte Parasitensuspension bereits für 20 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml Cytomix aufgenommen, wovon  $6 \cdot 10^7$  Parasiten entnommen und erneut wie zuvor zentrifugiert wurden. Die Tachyzoiten wurden erneut in 1 ml Cytomix aufgenommen. Die einen Tag zuvor präparierte DNA wurde mit 50 µl (=  $6 \cdot 10^6$  Parasiten) der Parasitensuspension vermischt, in eine 2 mm Transfektionsküvette überführt und mit Hilfe des *Amaxa*® *Nucleofector*® II Device (Programm T-016) transfiziert. Unmittelbar danach wurde 1 ml DMEM (2 % FKS) zugegeben und die Parasitensuspension auf zwei T25-Zellkulturflaschen oder bei einer transienten Transfektion in die Kavitäten einer 24-Lochplatte (mit Deckgläschen) mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen transferiert. Bei der transienten Transfektion wird im Gegensatz zur stabilen Transfektion kein Selektionsdruck angelegt, sondern der Pool an Transfektanten wurde mit Hilfe eines sich unmittelbar anschließenden IFAs untersucht (siehe 3.3.4). Als Kontrolle wurde stets ein Ansatz mitgeführt, in dem sich keine DNA befand, der zur Überprüfung der Vitalität ohne Selektionsdruck und zur Überprüfung der Selektion (bei einer stabilen Transfektion) mit Selektionsdruck behandelt wurde.

### MPA/XA Selektion

Bei der stabilen Transfektion der Plasmide piko-Fd, pG265 und pG265-Fd in  $\Delta$ HXGPRT-Stämme konnte aufgrund des in den gewünschten Genabschnitten der Plasmide enthaltenen HXGPRT-Gens mit MPA/XA positiv selektioniert werden. Diese positive Selektion ist möglich, da *T. gondii* für die Herstellung von Purinen von einem aktiven HXGPRT-Gen unabhängig ist. Adenosinmonophosphat kann in Inosinmonophosphat (IMP) umgewandelt werden und IMP wiederum in Xanthosinmonophosphat (XMP) und schließlich in Guanosinmonophosphat (GMP). Wird die IMP-Dehydrogenase, also die Umwandlung von IMP zu XMP, durch die Zugabe von MPA inhibiert, sind die Parasiten nun abhängig von einem aktiven HXGPRT, um GMP aus XA zu synthetisieren (Pfefferkorn und Borotz 1994, Donald *et al.* 1996). MPA/XA bewirkt das Absterben von nicht-transfizierten Parasiten nach ungefähr 2-3 d. Dazu wurde zunächst 6 h nach der Transfektion das Medium abgenommen und gegen DMEM (2 % FKS) mit MPA (25 µg/ml) / XA (50 µg/ml) versetzt ausgetauscht. Im Folgenden wurden die transfizierten Stämme regelmäßig alle zwei bis drei Tage durch die Spritze vereinzelt (siehe 3.3.2), das erhaltene Pellet in 500 µl DMEM (2 % FKS, 25 µg/ml MPA, 50 µg/ml XA) aufgenommen und auf eine neue T25-Zellkulturflasche mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen in entsprechendem Medium gegeben. Die T25-Zellkulturflaschen wurden solange bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert bis der Zellrasen beinahe flächendeckend infiziert und kurz vor der Lyse der Zellen war (4-6 d).

### FUDR Selektion

Für die stabile Komplementation des Fd ikd-Stammes wurde das Plasmid pGRA-UPRT-Fd generiert, welches die 3'- und 5'UTR des UPRT-Gens enthielt, wodurch das Konstrukt in diesen Genabschnitt doppelt homolog rekombinieren sollte (Donald und Roos 1995), da sich ein aktives UPRT-Gen als nicht essentiell für das Parasitenwachstum herausgestellt hat (Schwartzman und Pfefferkorn 1981, Iltzsch 1993). In diesem Fall erfolgt eine negative Selektion mit FUDR, wogegen erfolgreich transfizierte *T. gondii* resistent sind. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Parasiten einer T25-Zellkulturflasche wie in 3.3.2 beschrieben durch die Spritze vereinzelt und das Pellet in 500 µl DMEM (2 % FKS) aufgenommen und auf eine neue T75-Zellkulturflaschen mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen gegeben. Einen Tag später wurde das Medium gegen FUDR-haltiges (5 µM) DMEM (2 % FKS) ausgetauscht bevor wiederum einen Tag später die Zellen durch die Spritze vereinzelt und in eine neue T75-Zellkulturflaschen mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen in FUDR-haltiges DMEM (2 % FKS) gegeben wurden. Diese Prozedur wurde zwei weitere Male jeweils nach zwei Tagen wiederholt; die Zellen wurden dabei am Ende

lediglich in eine T25- anstatt einer T75-Zellkultuflasche überführt, welche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert wurde bis der Zellrasen beinahe flächendeckend infiziert und kurz vor der Lyse der Zellen war.

### Vereinzelung

Ziel einer stabilen Transfektion ist es, klonale Tachyzoitenkulturen zu erhalten, die mit Hilfe weiterer Analysen untersucht werden können. Um die Mischung der erhaltenen Transfektanten zu vereinzeln, wurden die entsprechenden Stämme gezählt (siehe 3.3.2), nachdem die Tachyzoiten der Kontrolle ohne Selektionsdruck abgestorben waren und die transfizierten Parasiten den Zellrasen flächendeckend infiziert hatten und kurz vor der Lyse der Zellen waren. In jede Kavität der ersten Spalte einer 96-Lochplatte mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen wurden 200 µl einer 500 Parasiten/ml-Zellsuspension gegeben. In einer seriellen Verdünnung wurden aus der ersten Spalte 50 µl zu den bereits vorgelegten 150 µl DMEM (2 % FKS, + MPA/XA oder FUDR) der zweiten Spalte gegeben und dies bis zur sechsten Spalte fortgesetzt. Der gleiche Ablauf wurde in den Spalten 7-12 wiederholt. Die 96-Lochplatte wurde ohne zwischenzeitliche Bewegung 7 d (MPA/XA) oder 10 d (FUDR) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Kavitäten auf die Anzahl vorhandener Plaques unter dem Mikroskop untersucht. Diejenigen Kavitäten, in denen sich nur ein Plaque befand, also eine klonale Tachyzoitenkultur hervorgegangen aus ursprünglich einem einzelnen Parasiten, wurden markiert und der Inhalt in je eine Kavität einer 24-Lochplatte mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen transferiert. Die frisch lysierten Tachyzoiten wurden dann zu einer HFF-Kultur in einer T25-Zellkultuflasche überführt und wie in 3.3.2 beschrieben passagiert. Weitere Analysen wie ein IFA (siehe 3.3.4) oder eine analytische PCR (siehe 3.1.4) nach der Extraktion genomischer DNA (siehe 3.1.2) schlossen sich an.

### 3.3.4 Immunfluoreszenz Assay

Für einen Immunfluoreszenz Assay (IFA) wurden stets wie in 3.3.1 beschrieben 24-Lochplatten mit Deckgläschen (Ø 10 mm) ausgestattet bevor die HFF-Zellen bis zur Konfluenz wuchsen und zur Infektion mit dem entsprechenden *T. gondii*-Stamm verwendet werden konnten. Die Wirtszellen in DMEM (2 % FKS) wurden mit Tachyzoiten infiziert, mit oder ohne Zugabe bestimmter Wirkstoffe zur Induktion (Knockout Parasitenstämme: 50 nM Rapamycin; Knockdown Parasitenstämme: 0,6 µg/ml ATc). Nach der gewünschten Behandlungsdauer wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen bevor die Zellen durch Zugabe von 200 µl 4 % PFA-Lösung in PBS für 20 min bei RT fixiert

wurden. Nach einem erneuten Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellen mit 200 µl Permeabilisierungspuffer für 20 min bei RT inkubiert bevor zum Blocken für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C 200 µl 3 % BSA-Lösung in PBS in die Kavitäten gegeben wurden. Der Inkubation mit 200 µl der entsprechenden Erstantikörper-Verdünnung in 3 % BSA-Lösung in PBS für 1 h bei RT folgte ein dreimaliger, zehnminütiger Waschschrift mit 1 ml PBS. Es schloss sich die Färbung mit 200 µl der Zweitantikörper-Verdünnung 3 % BSA-Lösung in PBS für 1 h bei RT abgedunkelt an. Im Anschluss wurden in die Kavitäten zur DNA-Färbung 200 µl einer 1 ng/µl DAPI-Lösung in PBS pipettiert, die erneut 10 min bei RT inkubierte. Daran fügte sich erneut ein dreimaliger, zehnminütiger Waschschrift mit 1 ml PBS. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer gebogenen Kanüle und Pinzette entnommen, auf 7 µl *Fluoromount*<sup>™</sup> auf Objektträgern gelegt und leicht angedrückt. Nach dem Aushärten üN konnten Aufnahmen am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome gemacht werden. Dabei wurde stets das 63x Objektiv zur Vergrößerung gewählt. Eine Bildbearbeitung hat mit den Programmen *AxioVision Rel. 4.8.* und *ImageJ 1.48v* stattgefunden. Die verwendeten Antikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen können Tab. 4 sowie den Angaben in den Abbildungen des Ergebnisteils (siehe Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18, Abb. 20, Abb. 22, Abb. 23) entnommen werden.

### 3.3.5 Plaqueassay

Mit Hilfe von Plaqueassays kann durch die Größe der entstandenen Plaques eine Aussage über das Wachstumsverhalten von unterschiedlichen *T. gondii*-Stämmen nach Induktion durch ATc getroffen werden. Die entsprechenden Stämme (Fd ikd, Fd ikd kompl., RHΔHXΔKU) wurden zunächst gezählt (3.3.2) und drei Kavitäten einer 12-Lochplatte mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen mit je 1 ml der gewünschten Parasitensuspension (70 Parasiten/ml) in DMEM (2 % FKS, ±ATc 0,6 µg/ml) befüllt. Die Platte wurde anschließend für 7 d ohne Berührung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums und einer 20 minütigen Inkubation bei RT mit 500 µl Toxo-Fixierlösung wurden 500 µl Kristallviolett-Lösung zum Anfärben auf den Zellrasen gegeben und für 5-10 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und Bilder der einzelnen Kavitäten aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *ImageJ 1.48v* und dem Plugin *Count\_Plaques\_Toolbox\_7* (geschrieben von Prof. Seeber), mit dessen Hilfe die Plaquegröße bestimmt werden konnte. Die Datenanalyse wurde mit Excel durchgeführt, wobei diejenigen Plaques, die als Einzelplaques definiert wurden, schließlich graphisch dargestellt wurden. Für

die statistische Analyse der aus drei biologischen Replikaten erhaltenen Plaquegrößen wurde das Programm *GraphPad Prism 5.04* verwendet.

### **CLEM (*Correlative Light and Electron Microscopy*) Analyse einzelner Plaques**

Um die Plaques ATc-behandelter *T. gondii*-Stämme (Fd ikd, Fd ikd kompl., RHΔHXΔKU) elektronenmikroskopisch mittels CLEM (*Correlative Light and Electron Microscopy*) in Anlehnung an das Protokoll von Madela *et al.* 2014 zu untersuchen, wurden die HFF-Zellen in  $\mu$ -dish-Zellkulturschalen passagiert und schließlich nach vorherigem Zählen (3.3.2) mit 200 Parasiten in 3 ml DMEM (2 % FKS, +ATc 0,6  $\mu$ g/ml) infiziert. Die Schale wurde anschließend für 7 d ohne Berührung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert bevor der Zellrasen nach Absaugen des Mediums mit 1 ml Klinikfixans für 20 min bei RT fixiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden drei Plaques pro Stamm am AxioObserver.Z1 unter Verwendung des 10x Objektivs mit Hilfe des in die  $\mu$ -dish-Zellkulturschalen eingezeichneten Koordinatensystems lokalisiert und aufgenommen. Pränante Stellen sind mit dem 40x Objektiv vergrößert aufgenommen worden. Die Bildbearbeitung hat mit den Programmen *ZEN 2012 (blue edition)* und *ImageJ 1.48v* stattgefunden. Die Nachfixierung und Einbettung der Proben wurde von Florian Müller durchgeführt (FG16, Robert Koch-Institut). So wurden die Schalen drei Mal für 10 min mit einer 0,01 M HEPES-Lösung gewaschen und in 1 % Osmiumtetroxid-Lösung für 1 h bei RT nachfixiert, woraufhin sich ein zweimaliges kurzes Waschen mit destillierten Wasser anschloss bevor zu den Schalen für 30 min eine 0,1 % Tannin-Lösung in 0,05 M HEPES gegeben wurde. Die Schalen wurden zwei Mal für 10 min in 1 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung in 0,05 M HEPES, drei Mal ebenfalls für 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen und für eine 1 h mit einer 2 % Uranylacetat-Lösung inkubiert. Die Entwässerung der Proben für jeweils 15 min wurde mit einer Ethanolreihe (70, 80, 90, 100 %) durchgeführt, wonach die Proben drei Mal mit Aceton für 15 min und im Anschluss jeweils für 1 h mit einem Aceton:Epoxidharz-Gemisch (3:1, 1:1, 1:3) inkubiert wurden. Es folgte eine üN-Inkubation bei RT in reinem Epoxidharz bevor erneut reines Epoxidharz für 4 h bei RT dazugegeben wurde und die Polymerisation schließlich für mehrere Tage bei 60 °C erfolgte. Die folgende Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (*thin section transmission electron microscopy*) wurde in Kooperation mit M. Laue (Konsiliarlabor für EM-Erregerdiagnostik, ZBS4, Robert Koch-Institut) von F. Müller vorgenommen.

### 3.3.6 Replikationsassay

Um eine mögliche Auswirkung des Fd Knockdowns im Fd ikd-Stamm auf die Verdopplungsrate der Parasiten zu untersuchen wurde ein Replikationsassay durchgeführt, bei dem während des ersten, zweiten und dritten lytischen Zyklus alle 12 h die Parasitenzahl pro Vakuole mit und ohne Induktion durch ATc bestimmt wurde. Dazu wurden 24-Lochplatten mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen, präpariert mit Deckgläschen (Ø 10 mm), nach dem Zählen (siehe 3.3.2) mit einer MOI von 4,4 mit den Stämmen (Fd ikd, Fd ikd kompl., RHΔHXΔKU) in DMEM (2 % FKS,  $\pm 0,6 \mu\text{g/ml}$  ATc) infiziert. Die Stämme wurden zuvor jeweils ebenfalls mit einer MOI von 4,4 0 d, 2 d bzw. 4 d (2+2 d) mit ATc (0,6  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorbehandelt. Als Kontrolle wurde Fd ikd zudem mit Pyrimethamin (5  $\mu\text{M}$ ) und CAM (20  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Alle 12 h wurden die Proben des jeweiligen Stammes und der jeweiligen Bedingung mit 200  $\mu\text{l}$  einer 4 % PFA-Lösung in PBS für 20 min bei RT fixiert und nach dem Waschen mit PBS bei 4 °C in PBS bis zur Analyse am AxioObserver.Z1 unter Verwendung des 40x Objektivs gelagert. Eine Bildbearbeitung hat mit den Programmen *ZEN 2012 (blue edition)* und *ImageJ 1.48v* (Plugin: *Cell Counter*) stattgefunden. Pro Stamm, Bedingung und Zeitpunkt wurden die Parasiten aus mindestens 50 Vakuolen gezählt. Zur graphischen Darstellung sowie statistischen Analyse wurde das Programm *GraphPad Prism 5.04* verwendet.

### 3.3.7 Motilitätsassay

Die bei der Fortbewegung von *T. gondii* hinterlassene Spur des sekretierten Oberflächenproteins SAG1 (Hakansson *et al.* 1999) kann angefärbt und vermessen werden. In je eine Kavität eines Achtloch-Objektträgers wurden 500  $\mu\text{l}$  50 % FKS in DMEM gegeben, für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS gespült. Währenddessen wurden die *T. gondii*-Stämme (Fd ikd, Fd ikd kompl., RHΔHXΔKU), die zuvor mit einer MOI von 4,4 vier Tage (2+2 d) in DMEM (2 % FKS,  $\pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) kultiviert wurden, gezählt (siehe 3.3.2). In je eine Kavität wurden 400  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Parasitensuspension ( $1 \cdot 10^7$  Parasiten/ml) gegeben, für 5 min bei RT stehengelassen und im Anschluss ohne Berührung für 15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem die Suspension vorsichtig auf ein Tuch ablaufen gelassen wurde, folgte die Fixierung mit 400  $\mu\text{l}$  4 % PFA-Lösung in PBS für 20 min bei RT. Nach dem Blocken mit 400  $\mu\text{l}$  3 % BSA in PBS schlossen sich die Erst- ( $\alpha$ -SAG1-AK; 1:1000) und die Zweitantikörper-Färbungen (Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546; 1:4000) wie in 3.3.4 beschrieben an. Die Kammervorrichtung des Objektträgers wurde im Anschluss abgelöst und ein ausreichend großes Deckglas auf *Fluoromount*<sup>TM</sup>

gegeben und angeedrückt. Nach dem Aushärten konnten die Aufnahmen am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome gemacht werden. Dabei wurde stets das 40x Objektiv zur Vergrößerung gewählt. Eine Bildbearbeitung hat mit den Programmen *AxioVision Rel. 4.8.* und *ImageJ 1.48v* stattgefunden. Für das Vermessen der Spuren wurde das Plugin *NeuronJ* (Meijering *et al.* 2004) auf die mit Hilfe des *Macro for Blind Analyses* (siehe <http://imagej.1557.x6.nabble.com/Macro-for-Blind-Analyses-td3687632.html>) zuvor zufällig angeordneten und umbenannten Aufnahmen angewandt. Aus drei biologischen Replikaten wurden pro Stamm und Bedingung mindestens 500 Spuren vermessen. Zur graphischen Darstellung sowie der statistischen Analyse wurde das Programm *GraphPad Prism 5.04* verwendet.

### 3.3.8 Fettsäuren-Extraktion

Um die Produkte der Isoprenoid- als auch der Fettsäuresynthese des Fd ikd-Stammes mittels GC-MS zu untersuchen, wurden die Parasiten durch Wachstum in  $^{13}\text{C}$ -Glukose-haltigem Medium metabolisch markiert. Die markierte Glukose wird verstoffwechselt und so in verschiedenste Metabolite integriert und kann nach Extraktion der Fettsäuren vermessen werden (Ramakrishnan *et al.* 2012). Der Fd ikd-Stamm wurde 2 d in D1-Medium ( $\pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) mit einer MOI von 4,4 im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Nach dem Passagieren der Tachyzoiten und einer erneuten Infektion von HFF-Zellen mit einer MOI von 4,4 wurden die unbehandelten Tachyzoiten für 15 h und die ATc-vorbehandelten für 20,5 h erneut in D1-Medium ( $\pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert bevor ein Mediumwechsel zu  $^{13}\text{C}$ -D1-Medium erfolgte. Nach weiteren 24 h wurde der Zellrasen der Zellkulturflaschen für 10 min auf Eis gekühlt und die Parasiten anschließend gezählt. Währenddessen wurde die unverdünnte Parasitensuspension bei 300 g für 20 min bei 0 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zentrifugation wurde zwei weitere Male wiederholt und schließlich die Parasitensuspension in drei 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils  $1 \cdot 10^8$  Parasiten gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 21500 g für 1 min bei 0 °C, woraufhin der Überstand abgenommen wurde und 100  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben wurden. Das Pellet wurde durch mehrmaliges Schaben über ein Gitter resuspendiert und im Anschluss jedes Reaktionsgefäß einzeln für 20 s in ein Ultraschallbad gegeben bevor 400  $\mu\text{l}$  eines 3:1 Methanol-Ethanol-Gemisches hinzupipettiert und mit Hilfe eines Vortex vermischt wurde. Die Lösungen wurden bei 10000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die so entstandene wässrige Phase in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Die organische Phase wurde ebenfalls in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit



vorgelegten 100 µl ddH<sub>2</sub>O überführt, welche wiederum mittels vortexen vermischt wurden bevor 100 µl einer frisch angesetzten 10 µM scyllo-Inositol-Lösung in Methanol hinzugefügt wurden. Die Lösungen der Reaktionsgefäße aller Ansätze wurden schließlich mit einem *SpeedVac*<sup>TM</sup> Concentrator getrocknet, zügig geschlossen, mit Parafilm<sup>®</sup> abgedichtet und vor dem Versand bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle kam ein Fd ikd-Stamm zum Einsatz, der auf ATc-Behandlung keinerlei Ansprechen zeigte (Daten nicht gezeigt). Die folgende Probenaufbereitung und die GC-MS Analyse wurde wie in Ramakrishnan *et al.* 2012 beschrieben in einer Kooperation mit M. Blume aus der McConville-Arbeitsgruppe der *University of Melbourne* (Australien) durchgeführt. Dort wurden die apolaren Metabolite einer Methanolyse in 0,5 M methanolischer HCl bei 80 °C für 4 h unterzogen. Die freien FS wurden in 1 % Trimethylsilyl (BSTFA-1 % TMS) für eine Stunde bei RT derivatisiert bevor die Proben schließlich auf einer DB-5MS plus DG Säule (30 m × 0,25 mm, 10 gap) am Agilent 7890A-5975C GC-MS analysiert wurden. Die Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software MSD Chemstation D.01.02.16 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bearbeitet.

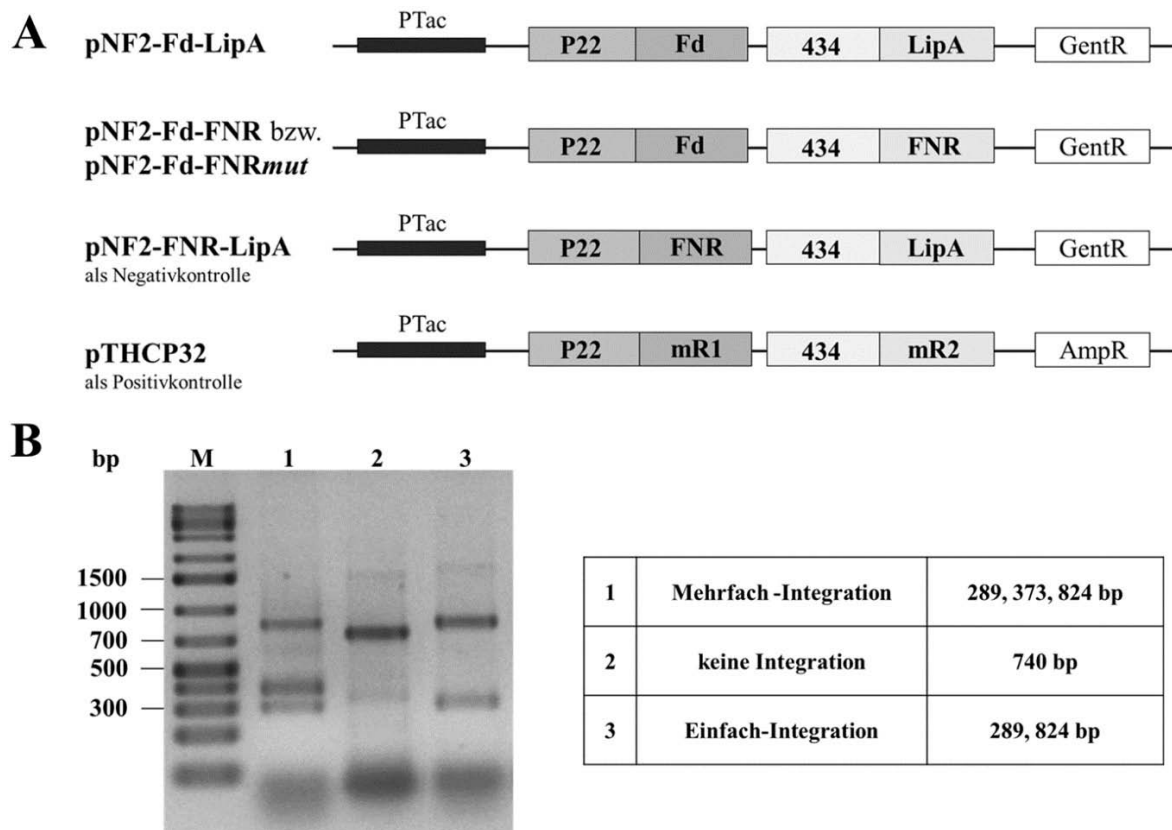
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Protein-Protein-Interaktionsstudien des Ferredoxin-Redoxsystems

#### 4.1.1 Erfolgreiche Herstellung der Interaktionsprotein-Plasmide und Integration dieser in den Reporterstamm

Als das einzig bekannte Redoxsystem nimmt das Ferredoxin-Redoxsystem eine zentrale Rolle im Metabolismus des Apicoplasten ein. Wie in 1.2 beschrieben, werden vermutlich mehrere Stoffwechselwege mit Hilfe des Ferredoxin-Redoxsystems mit Elektronen über direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) beliefert. Insbesondere von Interesse ist die Interaktion von Fd und seiner Reduktase, der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR), da dieses System bei der Übertragung von Reduktionsäquivalenten voraussichtlich im Mittelpunkt steht (siehe 1.2.1). Zudem scheint eine Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems bei der Lipoylierung der PDH-E2 Untereinheit wahrscheinlich, jedoch liegt bisher kein Nachweis der PPI von Fd und LipA vor (siehe 1.2.3). Das bakterielle *Reverse Two-Hybrid System* (RTHS) wird genutzt, um die PPI zweier Proteine zu ermitteln (siehe 1.2.4). Um eine mögliche Interaktion von Fd und LipA sowie von Fd und FNR zu untersuchen, wurden erfolgreich Plasmide generiert (siehe Tab. 15), die Fusionsproteine der jeweiligen Interaktionspartner (cDNA) mit jeweils einem der Repressorproteine P22 bzw. 434 enthalten (siehe Abb. 11A). Es wurde ein weiteres Plasmid mit den Interaktionspartnern Fd-FNR generiert, bei dem FNR eine Punktmutation besitzt (S267R). Diese Mutation bewirkte im *Yeast Two-Hybrid System* eine Inaktivierung des Enzyms, führte jedoch gleichzeitig zu einer stärkeren Bindungsaffinität zu Fd (Thomsen-Zieger *et al.* 2004). Zudem wurde ein Konstrukt als Negativkontrolle hergestellt, in dem LipA und FNR als Interaktionspartner hinterlegt waren (cDNA), da eine Interaktion zwischen diesen beiden als unwahrscheinlich angesehen wird (Frohnecke *et al.* 2015). Als Positivkontrolle diente ein zur Analyse der PPI zwischen den Untereinheiten der Ribonukleotid-Reduktase mR1/R2 bereits untersuchtes Plasmid von Horswill *et al.* 2004. Nach erfolgreicher Klonierung einer ersten Generation von Plasmiden mit einem Rhamnose-induzierbaren Promoter (pNF1 mit P<sub>RhaS</sub>, siehe 3.1.5) stellte sich bei quantitativen Analysen eine unzureichende Expression der  $\beta$ -Gal heraus. Daher wurde eine zweite Generation mit IPTG-induzierbarem Promoter kloniert (pNF2 mit P<sub>Tac</sub>, siehe 3.1.5), die eine ausreichende  $\beta$ -Gal-Aktivität zeigte (siehe 4.1.2). Die Konstruktschemata sind in Abb. 11A dargestellt und die Klonierungsstrategie ist in 3.1.5 beschrieben. Mit Hilfe der auf dem Helferplasmid pAH69

hinterlegten, temperatursensitiven Phagen-Integrase HK022 wurden die PPI-Plasmide über eine entsprechende *bacterial attachment* Stelle ( $att_{HK}$ ) in das *E. coli*-Genom des Reporterstammes SNS126F' integriert (siehe 3.2.4). Um zu überprüfen wie häufig der gewünschte Abschnitt integriert hat, wurde eine PCR-Reaktion der erhaltenen Bakterienkolonien, wie von Haldimann und Wanner 2001 beschrieben, durchgeführt. Die vier dazu genutzten Oligonukleotide ergeben in verschiedenen Kombinationen untereinander unterschiedliche Produktgrößen, je nachdem ob der gewünschte Abschnitt einmal, mehrfach oder nicht integrierte. Für jedes der klonierten Konstrukte wurden Kolonien erhalten, in denen der gewünschte Abschnitt einmal integriert hat (PCR-Produktgröße 740 bp), eine Mehrfach-Integration (PCR-Produktgrößen 289 und 824 bp) oder keine Integration (PCR-Produktgröße 289, 373 und 824 bp) des Abschnittes stattgefunden hat (siehe Abb. 11B).



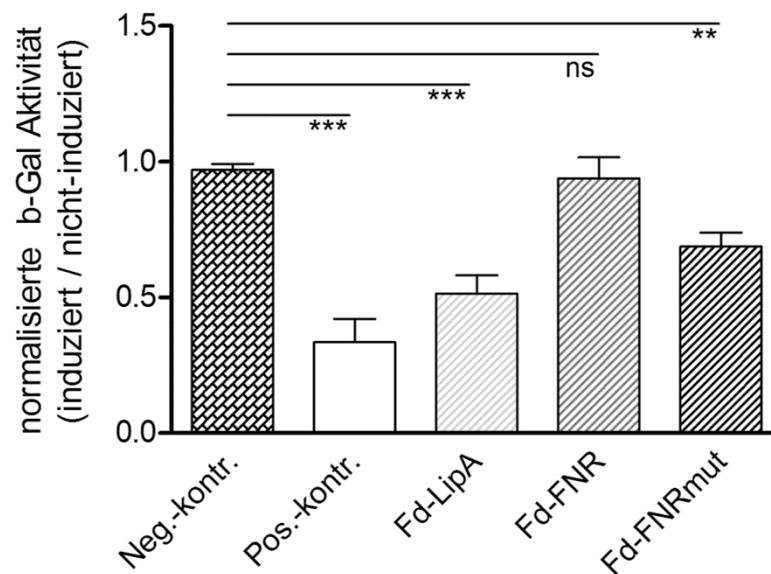
**Abb. 11: Genomische Integration der Protein-Protein-Interaktions-Plasmide**

**A** Übersichtsschemata der generierten PPI-Konstrukte. Jedes Plasmid besitzt den  $P_{Tac}$ -Promoter, der zwei Fusionsproteine exprimiert. Diese bestehen aus dem Repressorprotein P22 bzw. 434 und dem entsprechenden Interaktionspartner. Das Positivkontroll-Konstrukt pTHCP32 trägt ein AmpR-Gen, die anderen PPI-Plasmide ein GentR-Gen. **B** Nachweis der genomischen Integration durch eine PCR-Reaktion mit vier Oligonukleotiden, die in unterschiedlichen Kombinationen, je nach Anzahl der Integration des gewünschten Abschnitts, verschiedene Produktgrößen liefert (Haldimann und Wanner 2001). In einem Agarosegel sind die PCR-Produkte der PCR-Reaktion dreier Kolonien (1-3) nach Durchführung der Integration mit Hilfe des Helferplasmids pAH69 von beispielhaft pTHCP32 in SNS126F' dargestellt. In der Tabelle sind die zu erwartenden Produktgrößen nach Einfach-, Mehrfach- oder keiner Integration angegeben.

Bei den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Versuchen wurden diejenigen Stämme SNF2-Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR, SNF2-Fd-FNR*mut*, SNF2-FNR-LipA und SNS126F'32 verwendet, bei denen jeweils eine Einfach-Integration des gewünschten PPI-Abschnitts des jeweiligen Plasmids (pNF2-Fd-LipA, pNF2-Fd-FNR, pNF2-Fd-FNR*mut*, pNF2-FNR-LipA, pTHCP32) erfolgt ist. Die erfolgreiche Einfach-Integration der gewünschten PPI-Konstrukte schuf kontrollierte Bedingungen in den sich anschließenden Interaktionsanalysen, wie dem  $\beta$ -Gal-Assay und der Optimierung der Medienzusammensetzung (siehe 4.1.2 und 4.1.3).

#### 4.1.2 Nachweis der Interaktion von Fd und LipA

Das aus Ferredoxin (Fd) und der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) bestehende Ferredoxin-Redoxsystem ist mutmaßlich durch direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) von Fd und der Liponsäuresynthase (LipA) an der Übertragung von Reduktionäquivalenten bei der Liponsäuresynthese beteiligt. Zur Analyse der möglichen PPI von sowohl Fd-FNR und Fd-FNR*mut* als auch Fd-LipA wird das RTHS genutzt. Jeder der erfolgreich generierten RTHS-Stämme SNF2-Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR, SNF2-Fd-FNR*mut*, SNF2-FNR-LipA und SNS126F'32 (siehe 4.1.1) enthält drei Reportergene: das *lacZ*-, *HIS3* sowie KanR-Gen. Die Interaktionsanalyse findet aufgrund des *lacZ*-Gens statt, mit dessen Hilfe die Stärke einer Interaktion bestimmt werden kann. So wird  $\beta$ -Gal beim Ausbleiben einer Interaktion sowie ohne Induktion exprimiert; nach Induktion der Expression und Interaktion der Interaktionsproteine wird das *lacZ*-Gen jedoch reprimiert (siehe 1.2.4). Eine  $\beta$ -Gal-Aktivität kann mit einem  $\beta$ -Gal-Assay quantifiziert werden (siehe 3.2.5). Da es sich im Gegensatz zu den gängigen *Yeast Two-Hybrid* Systemen um ein umgekehrt funktionierendes *Two-Hybrid System* handelt (= *Reverse Two-Hybrid System*), kann bei Interaktion der exprimierten Fusionsproteine keine  $\beta$ -Gal-Aktivität quantifiziert werden. Die RTHS-Stämme wurden mit und ohne IPTG-Induktion über Nacht in Minimalmedium inkubiert. Eine geeignete IPTG-Konzentration (100  $\mu$ M) zur Induktion der Fusionsproteine wurde in Vorversuchen durch Titration ermittelt (Daten nicht gezeigt). Am folgenden Tag wurde die durch die  $\beta$ -Gal-Aktivität hervorgerufene Spaltung des farblosen Substrats ONPG in Galaktose und gelbes *o*-Nitrophenol der jeweiligen Bakteriensuspensionen bestimmt, indem das resultierende gelbe Produkt anschließend photometrisch bei 415 nm detektiert wurde. In Abb. 12 ist das Verhältnis des Mittelwerts der erhaltenen MUs aus vier unabhängigen, biologischen Replikaten der induzierten (= möglicherweise reprimierten) zur nicht-induzierten (= nicht-reprimierten) Kultur des jeweiligen RTHS-Stammes aufgetragen. Somit steht ein Verhältnis von „1“ für keine Interaktion (keine Repression) und ein Verhältnis von „0“ für



**Abb. 12: Fd und LipA interagieren im *Reverse Two-Hybrid* System**

Von den mit und ohne Induktion erhaltenen Bakterienkulturen der RTHS-Stämme (SNF2-Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR, SNF2-Fd-FNRmut, SNF2-FNR-LipA, SNS126F'32) wurde die  $\beta$ -Gal-Aktivität bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der Mittelwerte der MUs von vier unabhängigen biologischen Replikaten der induzierten (= möglicherweise reprimierten) zu den nicht-induzierten (= nicht-reprimierten) Bakterienkulturen ermittelt. Ein Verhältnis von „1“ bedeutet keine Interaktion (keine Repression), wohingegen ein Verhältnis von „0“ 100 % Repression, also maximal starke Interaktion bedeutet. Als Positivkontrolle diente der RTHS-Stamm SNS126F'32 (Horswill *et al.* 2004). Als nicht-interagierende Kontrolle kamen FNR und LipA zum Einsatz. Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage eines gepaarten t-Tests mit \*\*\*  $P \leq 0,0005$ , \*\*  $P \leq 0,005$ , ns = nicht signifikant

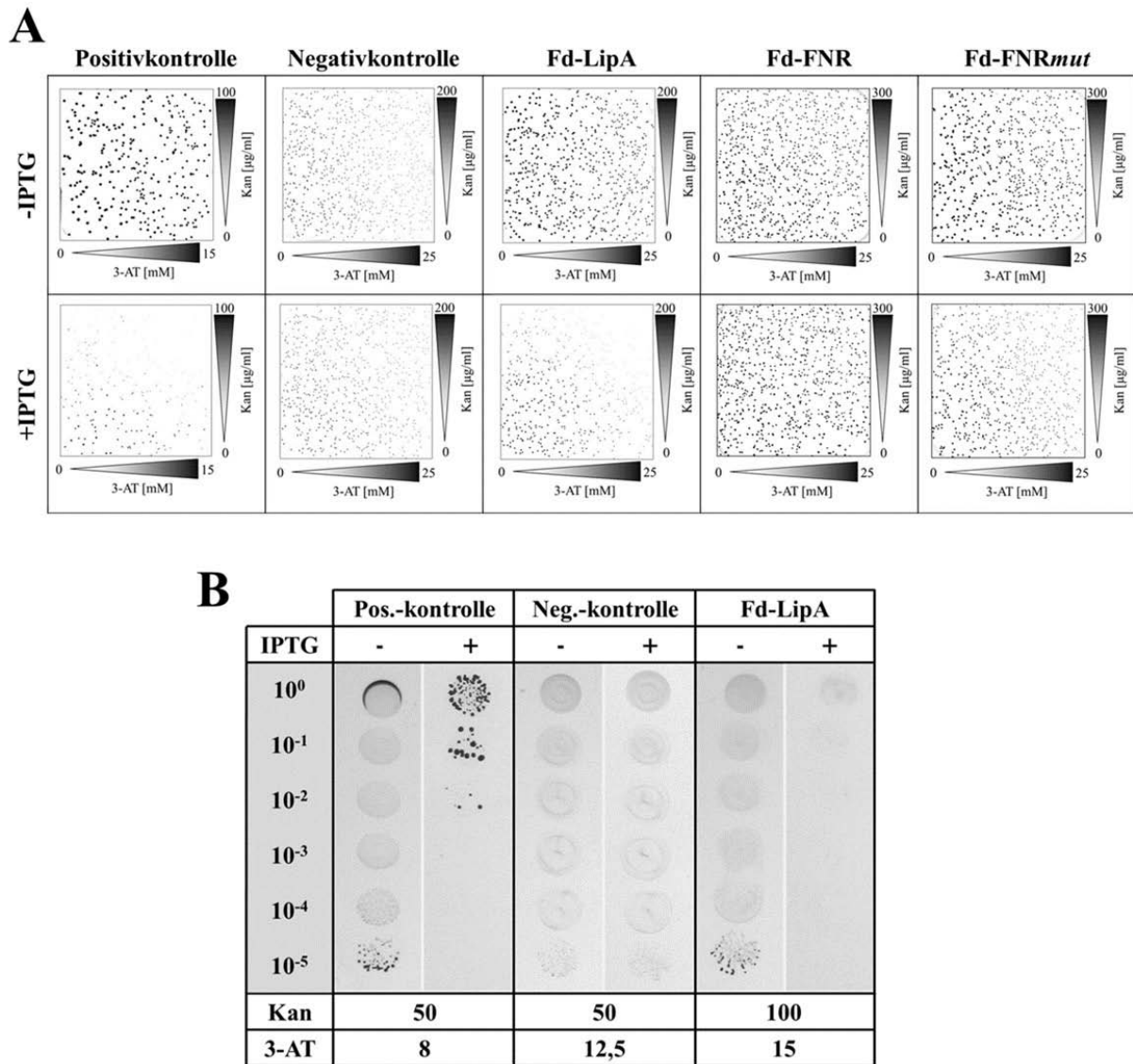
100 % Repression, repräsentativ für eine maximal starke Interaktion. Für die Negativkontrolle (SNF2-FNR-LipA) wurde ein Verhältnis von 0,97 erhalten, was wie erwartet keine PPI von FNR und LipA widerspiegelt. Die Positivkontrolle (SNS126F'32) war um 64 % reprimiert, was den Ergebnissen des  $\beta$ -Gal-Assays von Horswill *et al.* 2004 entspricht und eine Interaktion von mR1 und mR2 zeigt. Für die Interaktionsproteine Fd und LipA wurde ein Verhältnis von 0,51 bestimmt. Aufgrund der erhaltenen Repression von ungefähr 50 % weist dies eine Interaktion von Fd und LipA nach, wenn auch geringer als die der Positivkontrolle. Erstaunlicherweise ergab sich nach Durchführung des  $\beta$ -Gal-Assays für Fd-FNR eine Repression von 6 % (0,94), wonach eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen mit Hilfe dieses Systems nicht wahrscheinlich ist. Dies widerspricht den veröffentlichten Ergebnissen von Thomsen-Zieger *et al.* 2004, die eine Interaktion Fd und FNR im *Yeast Two-Hybrid* System dokumentierten. Dort wurde zudem gezeigt, dass eine Punktmutation im aktiven Zentrum von FNR zu einer Inaktivierung des Enzyms, jedoch gleichzeitig zu einer stärkeren Bindungsaffinität an Fd führt. Der Einsatz des RTHS-Stammes mit diesen Interaktionsproteinen (Fd-FNRmut) ergab eine ~30 %ige Repression (0,69), was für eine

mäßig starke Interaktion von Fd-FNR<sub>mut</sub> spricht. Trotz fehlender nachgewiesener Interaktion von Fd-FNR im RTHS, konnte - wie auch im *Yeast Two-Hybrid* System - eine Interaktion von Fd-FNR<sub>mut</sub> gezeigt werden.

Interagieren im RTHS zwei Proteine miteinander, kann z.B. eine zyklische Peptidbank mit den RTHS-Stämmen kombiniert werden, um Dissoziatoren der PPI zu finden (Horswill *et al.* 2004). Dies setzt eine Optimierung der Medienzusammensetzung voraus, die auf den beiden anderen Reportergenen (*HIS3*, KanR) der RTHS-Stämme beruht, um so die Anzahl falsch-positiv Kolonien zu minimieren. Dies ist jedoch nur möglich, wenn eine geeignete Medienzusammensetzung gefunden wird, bei der sicher zwischen induziert und nicht-induzierten (= Aufhebung der Interaktion durch einen Dissoziator) Bedingungen unterschieden werden kann. Die Ergebnisse des  $\beta$ -Gal-Assays lassen vermuten, dass dies lediglich für die getestete PPI von Fd-LipA möglich sein wird. Die mit diesem System gezeigte Interaktion zwischen Fd-FNR<sub>mut</sub> bzw. Fd-FNR scheint zu schwach oder mit Hilfe dieses Systems nicht nachweisbar zu sein.

#### **4.1.3 Stringente Screeningbedingungen des Fd-LipA-Reporterstammes durch Optimierung des Selektionsmediums**

Der durchgeführte  $\beta$ -Gal-Assay der RTHS-Stämme lässt eine Protein-Protein-Interaktion von Ferredoxin (Fd) und der Liponsäuresynthase (LipA) vermuten. Das RTHS kann zukünftig dazu verwendet werden Dissoziatoren dieser PPI zu ermitteln, indem beispielsweise eine zyklische Peptid-Bank in den entsprechenden Stamm eingebracht wird. Eine Voraussetzung dafür ist die Optimierung der Medienzusammensetzung für ein späteres Screening, da sicher zwischen induzierten und nicht-induzierten Bedingungen unterschieden werden muss. Die nicht-induzierten Bedingungen sind dabei mit der Aufhebung der Interaktion durch einen Dissoziator gleichzusetzen, wobei das Ablesen der nachgeschalteten Reportergene weiterhin möglich ist und die Bakterien bei geeigneter Medienzusammensetzung entsprechend wachsen (siehe Abb. 7). Neben dem *lacZ*-Gen, das zur Durchführung des  $\beta$ -Gal-Assays benötigt wurde, befinden sich in der Reporterkassette der RTHS-Stämme zum einen ein *HIS3*- und zum anderen ein KanR-Gen. Das *HIS3*-Genprodukt komplementiert eine Histidin Auxotrophie der RTHS-Stämme und ermöglicht neben dem KanR-Genprodukt bei Verwendung eines Minimalmediums ohne Histidin bei Zugabe von 3-AT und Kan eine Selektion. Bei 3-AT handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes, welches eine chemische Kontrolle der Hintergrundexpression ermöglicht. Die benötigte Konzentration von Kan und 3-AT zur Selektion unterscheidet sich je nach Interaktionsstärke



**Abb. 13: Optimierung der Medienzusammensetzung durch Titration von 3-AT und Kanamycin**

**A** Zur Ermittlung der Medienzusammensetzung wurde auf Gradientenplatten mit einem senkrecht zueinander verlaufenden Gradienten von 3-AT und Kan (siehe Abb. 10B, jeweilige Konzentrationsbereiche siehe Achsenbeschriftung) mit und ohne IPTG-Induktion eine Verdünnung der Bakterienkultur (siehe 3.2.6) der jeweiligen RTHS-Stämme ausgestrichen und für 72 h bei 37 °C inkubiert. **B** Eine serielle Verdünnung der Bakterienkulturen der RTHS-Stämme beginnend bei einer OD<sub>600</sub> von 0,07 wurde auf Agarplatten mit einer bestimmten Konzentration (siehe Angaben in der Tabelle) von 3-AT und Kan aufgetragen und für 72 h bei 37 °C inkubiert. (SNF2-Fd-LipA: Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR: Fd-FNR, SNF2-Fd-FNR<sub>mut</sub>: Fd-FNR<sub>mut</sub>, SNF2-FNR-LipA: Negativkontrolle, SNS126F'32: Positivkontrolle)

der zu untersuchenden Interaktionspartner und wird daher für jeden der RTHS-Stämme (SNF2-Fd-LipA, SNF2-Fd-FNR, SNF2-Fd-FNR<sub>mut</sub>, SNF2-FNR-LipA, SNS126F'32) individuell bestimmt. Durch den Einsatz geeigneter Konzentrationen von Kan und 3-AT ist eine Identifikation eines Inhibitors der PPI nach Induktion der RTHS-Stämme möglich (Horswill *et al.* 2004). Um einen Hinweis auf die einzusetzenden 3-AT- bzw.

Kan-Konzentrationen zu erhalten, wurden Gradientenplatten mit und ohne IPTG-Zusatz mit einem senkrecht gegeneinander verlaufenden Gradienten von 3-AT und Kan hergestellt (siehe Abb. 10B). Nach Inkubation der Gradientenplatten (72 h, 37 °C) mit einer Verdünnung der jeweiligen RTHS-Bakterienkulturen (siehe 3.2.6) ohne IPTG-Induktion waren bei allen drei Stämmen Bakterienkolonien bei jeder 3-AT- und Kan-Konzentration zu erkennen (siehe Abb. 13A, obere Reihe). Auf den Gradientenplatten, die IPTG enthielten, war außer für den Negativkontrollstamm (SNF2-FNR-LipA) und - wie nach Durchführung des  $\beta$ -Gal-Assays zu erwarten - für den Fd-FNR-Stamm (SNF2-Fd-FNR), jeweils ein Konzentrationsbereich ersichtlich, indem keine Kolonien des Positivkontroll- (SNS126F'32) sowie des Fd-LipA-Interaktions-Stammes gewachsen waren (siehe Abb. 13B, untere Reihe). Der RTHS-Stamm mit den PPI-proteinen Fd und FNR $mut$  wies nach Induktion schwächer angefärbte Kolonien auf, jedoch waren auch hier trotz höher gewählter, maximaler Kan-Konzentration (300  $\mu$ g/ml) bei jedem Konzentrationsbereich von 3-AT und Kan Kolonien ersichtlich. Bei der Positivkontrolle wuchsen insbesondere bei einer Konzentration von  $\sim$ 7,7-15 mM 3-AT und  $\sim$ 50-100  $\mu$ g/ml Kan keine Kolonien; bei dem RTHS-Stamm SNF2-Fd-LipA handelte es sich um einen Konzentrationsbereich von  $\sim$ 15-25 mM 3-AT und  $\sim$ 100-200  $\mu$ g/ml Kan, in dem keine Kolonien wuchsen.

Um definitive und stringente Konzentrationen für 3-AT und Kan insbesondere für den RTHS-Stamm SNF2-Fd-LipA sowie den Positivkontrollstamm zu erhalten, wurden Agarplatten mit und ohne IPTG-Zusatz mit Konzentrationen der beiden Wirkstoffe in den mit den Gradientenplatten bestimmten Bereichen angefertigt und eine serielle Verdünnung der Bakterienkulturen aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Für die RTHS-Stämme SNF2-Fd-FNR und SNF2-Fd-FNR $mut$  konnte auch nach Anfertigung einzelner Platten mit weiteren, hohen Konzentrationen von 3-AT und Kan kein unterschiedliches Wachstum mit oder ohne Induktion festgestellt werden. In Abb. 13B ist das Bakterienwachstum von SNF2-Fd-LipA, SNF2-FNR-LipA und SNS126F'32 bei denjenigen Konzentrationen von 3-AT und Kan gezeigt, welches bei ausreichender Verdünnung der jeweiligen RTHS-Bakterienkultur zu einer Diskriminierung zwischen induziert und nicht-induziert führt. So wuchsen bei einer  $10^{-3}$ -Verdünnung einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,07 der Positivkontrolle (SNS126F'32) nach Induktion sowie 8 mM 3-AT und 50 mg/ml Kan keine Kolonien im Vergleich zu der Agarplatte, die kein IPTG enthielt. Bei dem RTHS-Stamm mit den Interaktionsproteinen Fd und LipA (SNF2-Fd-LipA) waren nach Induktion ab einer Verdünnung von  $10^{-2}$  und einer Konzentration von 15 mM 3-AT sowie 100  $\mu$ g/ml Kan keine Kolonien im Vergleich zu den nicht-induzierten Bedingungen ersichtlich. Bei der Negativkontrolle wuchsen stets, ob mit



oder ohne Induktion und unabhängig von der verwendeten Verdünnung, Kolonien auf den Agarplatten. In allen verwendeten Agarplatten befand sich 0,01 % TTC, welches metabolisch aktive Bakterienzellen durch die Bildung eines roten Farbstoffs anfärbt (Kuhn und Jerchel 1941, Fred und Knight 1949). Bei den Gradientenplatten wurden die Kolonien durch die rote Färbung sehr gut sichtbar. Auf den anderen Agarplatten, zur Bestimmung der expliziten 3-AT- und Kan-Konzentration hingegen (siehe Abb. 13B), wurden lediglich diejenigen Zellen angefärbt, die einzelne Kolonien bildeten oder sich am Rand eines Bakterienrasens befanden. Insgesamt jedoch war die Farbtintensität der Bakterienzellen der SNF2-Stämme geringer als die des Positivkontrollstammes (SNS126F'32).

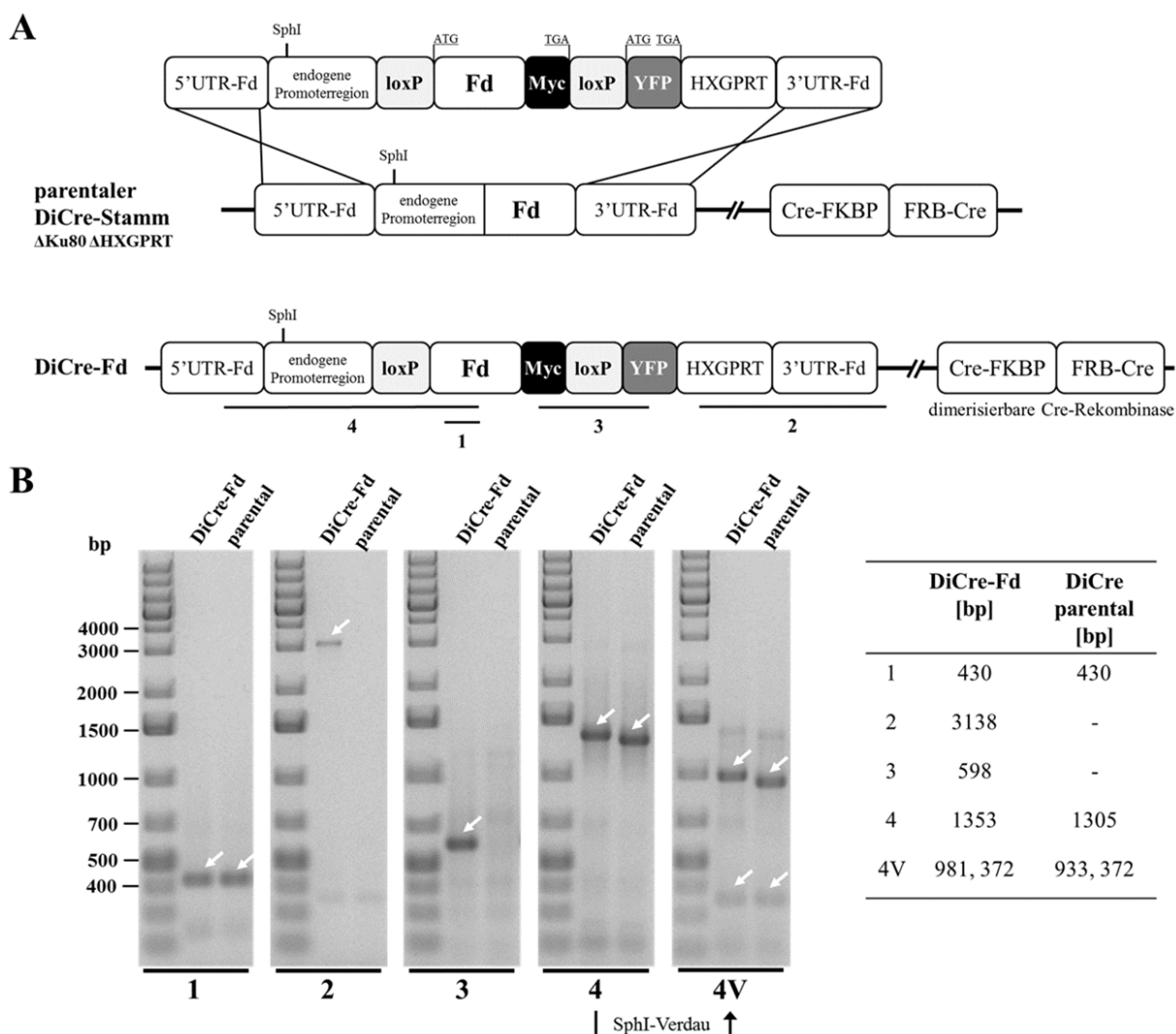
Die Optimierung der Selektionsbedingungen aber auch der  $\beta$ -Gal-Assay zeigte, dass eine Kombination mit einer zyklischen Peptidbank lediglich für den Fd-LipA RTHS-Stamm (SNF2-Fd-LipA) möglich ist. Denn nur bei diesem Stamm - im Gegensatz zu den RTHS-Stämmen SNF2-Fd-FNR und SNF2-Fd-FNR*mut* - wurde eine Medienzusammensetzung gefunden, bei der stringent zwischen induzierten und nicht-induzierten Bedingungen diskriminiert werden konnte. Die nicht-induzierten Bedingungen mimen dabei diejenigen Bedingungen, bei denen ein Dissoziator die Interaktion der beiden Proteine inhibiert und somit die Repression der nachgeschalteten Reporterkassette ausbleibt.

## **4.2 Ein *T. gondii* Ferredoxin Knockout durch konditionale Exzision des Ferredoxin-Gens**

### **4.2.1 Das konditionale Ferredoxin-Knockout Konstrukt ersetzt erfolgreich den endogenen Ferredoxin-Genabschnitt**

Das Ferredoxin-Redoxsystem spielt eine zentrale Rolle in mehreren, essentiellen Synthesewegen für verschiedene Metabolite, wie den Isoprenoidvorstufen als auch der Liponsäure, im Apicoplasten von *T. gondii* (siehe 1.2). Sofern Fd essentiell für das Überleben von *T. gondii* ist, sollte ein Fd-Gen Knockout zu einem komplexen biochemischen Phänotyp bis zum Absterben der Parasiten führen. Das verwendete Knockout-System basiert auf einer konditionalen, Cre-vermittelten Exzision des gewünschten, loxP-flankierten Genabschnitts (Einzelheiten siehe 1.3). Der Ferredoxin-Genabschnitt wurde daher gegen ein loxP-flankiertes und Myc-markiertes Fd mit endogener Promoterregion bzw. einem Tub8-Promoter ausgetauscht (Andenmatten *et al.* 2013). Das entsprechend klonierte Plasmid mit endogener Promoterregion pG265-Fd (siehe 3.1.5) wurde stabil transfiziert (siehe 3.3.3) und mittels

doppelt homologer Rekombination in den Stamm DiCre integriert (siehe Abb. 14A). Dem parentalen DiCre-Stamm fehlen sowohl das Ku80-Protein des *non-homologous end joining pathways* (NHEJ), wodurch die Effizienz der doppelt homologen Rekombination erhöht wird (siehe 1.3, Fox *et al.* 2009, Huynh und Carruthers 2009), als auch die Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HXGPRT), wodurch nach erneutem Einbringen des HXGPRT-Gens eine Selektion mit MPA/Xanthin möglich ist (siehe 3.3.3,

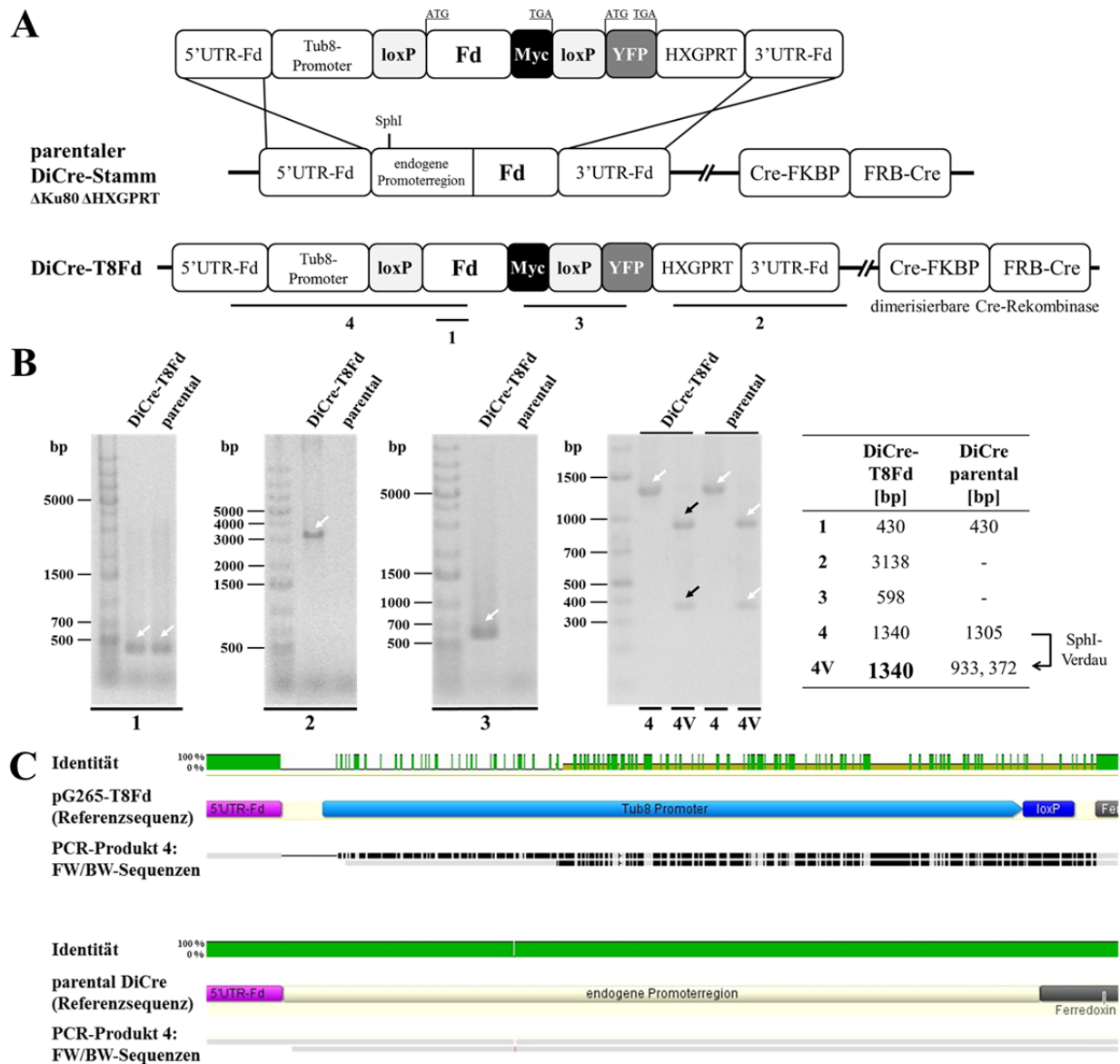


**Abb. 14: Gezielter Genaustausch von endogenem Fd zu loxP-flankiertem Fd (endogener Promoter)**

**A** Schema des gezielten Fd Genaustauschs durch doppelt homologe Rekombination. Das loxP-flankierte und Myc-markierte Fd-Gen wird von jeweils einer 3' und 5'UTR umgeben und ersetzt das endogene Fd (Chr X) im DiCre-Fd-Stamm. Eine dimerisierbare Cre-Rekombinase (Cre-FKBP, FRB-Cre) ist in den parentalen DiCre-Stamm integriert (Chr XI), wodurch eine Rapamycin-induzierbare Exzision des Fd-Gens gewährleistet wird. Größen der Komponenten: 5'/3'UTR-Fd: ~2 kb; endogene Promoterregion: 500 bp; loxP: 34 bp; Fd: 1998 bp; Myc-Tag: 30 bp; YFP: 718 bp; HXGPRT: 649 bp; Cre-FKBP/FRB-Cre: nicht bekannt. **B** Nachweis über den Einbau des loxP-flankierten Fd-Gens am Fd-Genlokus in den DiCre-Fd-Stamm durch analytische PCR-Reaktionen. Die Oligonukleotid-Bindungsstellen sind im Konstruktschema in A dargestellt. Die zu erwartenden PCR-Produktgrößen sind in der Tabelle gelistet und im Gel mit Pfeilen markiert.

Pfefferkorn und Borotz 1994, Donald *et al.* 1996). Zusätzlich enthält der DiCre-Stamm eine dimerisierbare Cre-Rekombinase, die erst nach Zugabe des Liganden Rapamycin aufgrund der Fusion beider Cre-Teile an die Rapamycin-bindenden Proteine FKBP und FRB dimerisiert und funktionsfähig ist. Nach dementsprechender Selektion mit MPA/Xanthin und Vereinzelung der Transfektanten zur Analyse einzelner, klonaler Tachyzoitenkulturen wurde mit Hilfe eines PCR-Screenings und der Verwendung geeigneter Oligonukleotid-Kombinationen (siehe 3.1.4) der erfolgreiche Austausch des endogenen Fd-Genabschnitts gegen das loxP-flankierte Fd-Myc mit dem endogenen Promoter überprüft (Abb. 14B, DiCre-Fd). Als Bestätigung der Fd Myc-Markierung konnte demnach eine Bande mit einer Größe von 598 bp bei DiCre-Fd nachgewiesen werden (Kombination 3). Das Vorhandensein von Fd sowohl im parentalen DiCre- als auch im DiCre-Fd-Stamm wurde mit Hilfe der ersten Oligonukleotid-Kombination durch eine Bande mit einer Größe von 430 bp gezeigt. Die Integration aufwärts vom konditionalen Fd-Konstrukt wurde durch die Detektion einer Bande mit einer Größe von 3138 bp in der zweiten PCR-Reaktion geprüft. Der Nachweis der Integration abwärts des Fd-Genabschnitts verlief in zwei Schritten: mit einer PCR-Reaktion (Kombination 4) wurde zunächst eine Bande mit einer Größe von 1353 bp für DiCre-Fd und von 1305 bp für den parentalen DiCre-Stamm detektiert. Da eine Unterscheidung dieser Produktgrößen in einem Agarosegel nach einem Restriktionsverdau besser auszumachen ist, wurde das erhaltene PCR-Produkt mit *SphI* verdaut (4V), welches nur in der endogenen Promoterregion eine Restriktionsenzym-Schnittstelle besitzt. So wurden für DiCre-Fd und den parentalen DiCre-Stamm je eine Bande mit einer Größe von 372 bp und eine größere Bande mit 981 bp (DiCre-Fd) bzw. 933 bp (DiCre-Stamm) erhalten. Der Größenunterschied der hier erhaltenen größeren Banden konnte im Agarosegel sehr gut erkannt werden (Abb. 14B). Zudem war bei DiCre-Fd keine Doppelbande (981 und 933 bp) ersichtlich, weshalb von einer korrekten Integration abwärts des Konstruktes auszugehen ist. Zusammenfassend konnte demnach eine klonale DiCre-Fd Tachyzoitenkultur generiert werden, die für alle durchgeführten PCR-Reaktionen ein positives Ergebnis lieferte. Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente bestätigte den Einbau des loxP-flankierten Fd-Myc mit endogener Promoterregion.

Ein weiteres Fd Knockout Plasmid mit Tub8-Promoter (pG265-T8Fd) wurde kloniert und ebenfalls stabil transfiziert (siehe Abb. 15A). Die PCR-Reaktionen 1-4 verliefen auch hier positiv und deuteten auf eine korrekte Integration des Konstruktes hin (siehe Abb. 15B). Ein *SphI*-Verdau des PCR-Produktes der Oligonukleotid-Kombination 4 war jedoch - anders als für die Tub8-Promoterregion erwartet - möglich (4V, schwarze Pfeile). Nach Sequenzierung



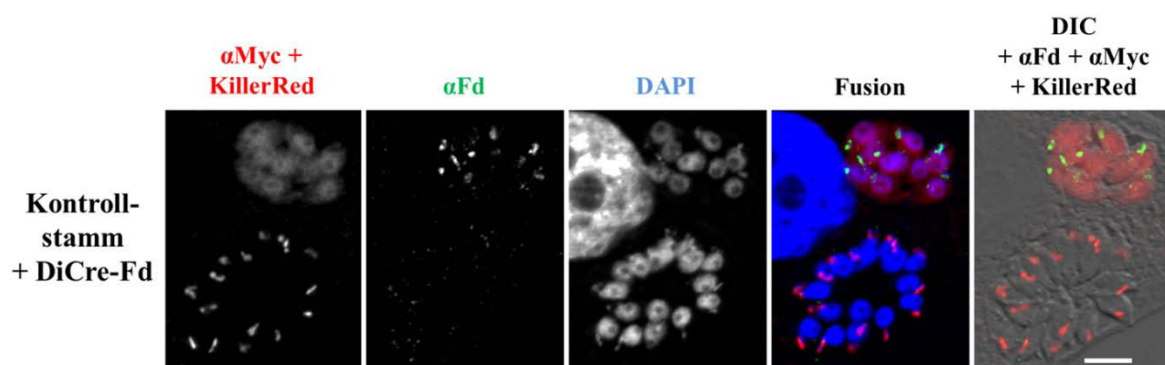
**Abb. 15: Unvollständiger Genaustausch von endogenem Fd zu loxP-flankiertem Fd (Tub8-Promoter)**

**A** Schema des gezielten Fd Genaustauschs durch doppelt homologe Rekombination. Das loxP-flankierte und Myc-markierte Fd-Gen mit Tub8-Promoter wird von jeweils einer 3' und 5'UTR umgeben und ersetzt das endogene Fd (Chr X) im DiCre-T8Fd-Stamm. In den parental DiCre-Stamm ist, wie in Abb. 14 beschrieben, eine dimerisierbare Cre-Rekombinase integriert. Größen der Komponenten: Tub8-Promoter:455 bp, restliche Größen sind in Abb. 14 angegeben. **B** Nachweis über den Einbau des mit nur einer loxP-Sequenz versehenen Fd-Gens und der endogenen Promoterregion anstatt des Tub8-Promoters (schwarze Pfeile) am Fd-Genlokus durch analytische PCR-Reaktionen. Die Oligonukleotid-Bindungsstellen sind im Konstruktschema in A dargestellt. Die zu erwartenden PCR-Produktgrößen sind in der Tabelle gelistet und im Gel mit Pfeilen markiert. **C** Alignment der nach Sequenzierung des PCR-Produkts 4 erhaltenen FW/BW-Sequenzen (beispielhaft von einer klonalen Tachyzoitenkultur) und des Plasmids pG265-T8Fd (oben) bzw. des parental DiCre-Stammes (unten). Die in dunkelgrün markierten Bereiche zeigen eine 100%ige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz an. Bei den FW/BW-Sequenzen des PCR-Produkts 4 entsprechen hellgrau-markierte Bereiche der Sequenz einer Übereinstimmung und schwarz-markierte Bereiche einer Abweichung.

des PCR-Produktes stellte sich heraus, dass keiner der 35 untersuchten stabil transfizierten, klonalen Tachyzoitenkulturen DiCre-T8Fd den Tub8-Promoter sowie die vordere der beiden loxP-Seiten enthielten, sondern stets die endogene Promoterregion des parental DiCre-Stammes (siehe Abb. 15C), weshalb dieses Konstrukt ausschließlich bei transienten Transfektionen genutzt wurde (siehe 4.2.3 und 4.2.4).

Neben den zuvor beschriebenen Transfektionen der Fd Knockout-Konstrukte (pG265-Fd, pG265-T8Fd) wurde zudem ein Kontrollstamm generiert, bei dem das Plasmid pG265 stabil und an zufälliger Stelle in das Genom des DiCre-Stammes homolog rekombiniert hat (siehe Tab. 8). Bei diesem Stamm (DiCre-265) handelt es sich bei dem in Abb. 9B gezeigten GOI um *KillerRed*, weswegen die Parasiten bei der Fluoreszenz-Mikroskopie eine rote Fluoreszenz zeigen sollten.

Um den erfolgreichen Austausch des endogenen Fd samt endogener Promoterregion gegen das loxP-flankierte, Myc-markierte Fd ebenfalls mit endogener Promoterregion (DiCre-Fd) mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachzuweisen, wurde eine Mischung des DiCre-265 Kontroll- und des DiCre-Fd-Stammes untersucht. Nach 24 stündiger Koinfektion eines homogenen Gemisches dieser beiden Stämme wurden die Zellen fixiert, freie Bindungsstellen blockiert und eine Färbung des endogenen Fd mit Hilfe eines polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serums vorgenommen. Der Kontrollstamm zeigte, wie erwartet, rot-fluoreszierende Parasiten. Jedoch konnte endogenes Fd lediglich in den Parasiten des Kontrollstammes mit Hilfe dieses Serums detektiert werden (siehe Abb. 16, zweite Aufnahme). Das Myc-markierte Fd aus dem DiCre-Fd-Stamm konnte hingegen trotz der Verwendung eines polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serums nicht gefärbt werden. Die Detektion des C-terminal Myc-markierten Fd dieser



**Abb. 16: Nachweis des Myc-markierten Fd in der Fd DiCre Knockout-Mutante (DiCre-Fd)**

Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme einer Mischkultur des stabil transfizierten DiCre-Fd- und des Kontrollstammes (DiCre-265, loxP-flankiertes *KillerRed*). Nach 24 h Infektion wurden die Zellen fixiert und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Die Zellen wurden mit einem  $\alpha$ -Fd-Antikörper 1:500 (Ziege- $\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor® 488, 1:1000) sowie  $\alpha$ -Myc-Antikörper 1:4000 (Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546, 1:4000) gefärbt und am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome aufgenommen. Ein repräsentativer Versuch von drei Wiederholungen ist dargestellt. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

Parasiten ist dort mit einem  $\alpha$ -Myc-Antikörper möglich (siehe Abb. 16, Pfeil). Eine Kolokalisation der erhaltenen Fd-Signale, sowohl des Kontroll- als auch des DiCre-Fd-Stammes, mit der DAPI-gefärbten doppelsträngigen DNA des Apicoplasten ist nach der Fusion der erhaltenen Signale zu erkennen. Die C-terminale Markierung mit dem Myc- oder auch dem HA-Tag (siehe 4.3.2) führt bei dem relativ kleinen Protein Fd (12 kDa) vermutlich zu einer sterischen Hinderung der Bindung der Antikörper aus dem polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serum. So führt bereits der kürzere 6His-Tag (18 bp) bei der Analyse verschiedener Proteine zu Konformationsänderungen und veränderten biochemischen Eigenschaften (Goel *et al.* 2000, Chant *et al.* 2005, Horchani *et al.* 2009), weshalb eine sterische Inhibition durch die 30 bp-lange Myc- oder der 27 bp-lange HA-Markierung denkbar ist. Der Fd Nachweis erfolgte in diesen Fällen daher über die eingebrachte Markierung (Myc, HA) und nicht mit Hilfe des polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serums.

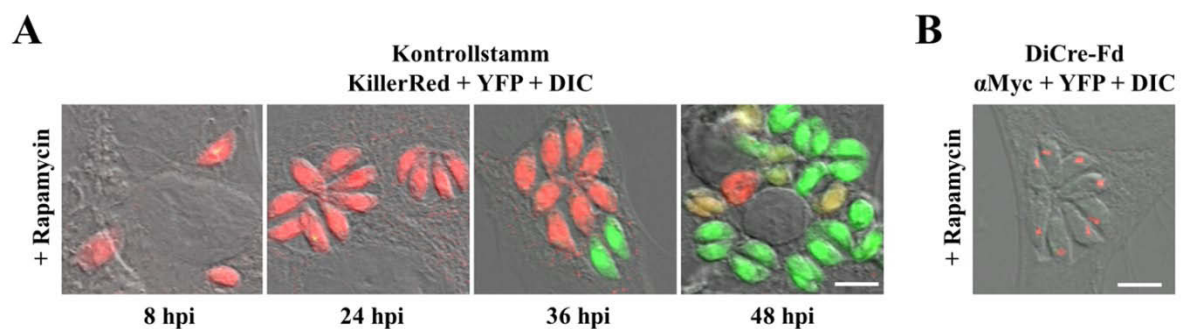
Wie zu erwarten, blieben so auch Versuche das Myc-markierte Fd des Knockout-Stammes in der Western Blot Analyse mit dem  $\alpha$ -Fd-Serum nachzuweisen erfolglos (Daten nicht gezeigt). Zudem war es nicht möglich - trotz der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Herstellung von *T. gondii*-Lysaten, dem Einsatz verschiedener Proteinmengen und der Variation der Antikörperversdünnungen (Erst- und Zweitantikörper) - das Myc-markierte Fd mit Hilfe des  $\alpha$ -Myc-Antikörpers in der Western Blot Analyse zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Dass Myc-markierte Proteine in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie allerdings nicht in der Western Blot Analyse durch den  $\alpha$ -Myc-Antikörper detektiert werden können, wurde bereits von Fan *et al.* 1998 beschrieben. Abgesehen davon war es im Rahmen dieser Arbeit weder möglich markiertes noch nicht-markiertes Fd aus *T. gondii*-Lysaten per Western Blot Analyse mit Hilfe verschiedener Antikörper nachzuweisen. Neben der Tatsache, dass es sich bei Fd um ein kleines, sehr geladenes Protein handelt, welches sich in der Vergangenheit bereits als in der Western Blot Analyse schwer detektierbar erwies (Pankowski und McMin 2009), scheint die von *T. gondii* exprimierte Proteinmenge (siehe 4.2.5) oder die Sensitivität der vorhandenen Antikörper nicht ausreichend zu sein. Letztgenannter Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da der Fd-Nachweis mit der Fluoreszenz-Mikroskopie und dem  $\alpha$ -Myc-Antikörper erfolgte.

Hervorzuheben ist, dass ein konditionaler Fd Knockout-Stamm mit endogener Promoterregion (DiCre-Fd) erfolgreich generiert werden konnte. Das klonierte Plasmid pG265-Fd wurde korrekt in den parental DiCre-Stamm integriert und zeigte zudem in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen die eingebrachte Myc-Markierung. Die Transfektion und korrekte Integration eines zweiten Fd Knockout-Konstrukts mit

Tub8-Promoter blieb dagegen erfolglos. Des Weiteren wurde der Kontrollstamm DiCre-265 hergestellt. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Systems durch eine Rapamycin-induzierte Exzision von Fd bzw. *KillerRed* sowohl des DiCre-Fd- als auch des Kontrollstammes schloss sich an, bei der die nach erfolgreicher Exzision verursachte grüne Fluoreszenz der Parasiten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht wurde.

#### 4.2.2 Rapamycin-Induktion führt zu keiner Fd Exzision in der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion in *T. gondii*

Mit Hilfe des konditionalen DiCre Knockout Systems (siehe 1.3) soll die voraussichtlich zentrale Funktion von Fd im Metabolismus des Apicoplasten untersucht werden (1.2.1). Die Exzision von einem loxP-flankierten Gen wird durch die nach Zugabe von Rapamycin bewirkte Dimerisierung der als zwei Fusionsproteine vorliegenden Cre-Rekombinase des verwendeten DiCre-Stammes hervorgerufen. Dadurch wird die Expression eines YFP-Gens möglich, so dass die resultierenden Parasiten grün fluoreszieren (siehe Abb. 9B, Andenmatten *et al.* 2013). Nach der stabilen Transfektion und erfolgreichen doppelt homologen Rekombination des gewünschten Bereichs des Plasmids pG265-Fd mit endogener Promoterregion (siehe 4.2.1) wurde die klonale Tachyzoitenkultur des so erhaltenen DiCre-Fd-Stammes sowie die klonale Tachyzoitenkultur aus der Transfektion eines Kontrollplasmids (pG265, enthält loxP-flankiertes *KillerRed*) mit Rapamycin behandelt. Nach unterschiedlich langen Induktionszeiten (8, 24, 36, 48, 72, 96 h) wurden die Zellen fixiert und



**Abb. 17: Keine Fd Exzision in der Fd Knockout-Mutante nach Rapamycin-Behandlung nachweisbar**

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des stabil transfizierten Kontrollstammes (DiCre-265, loxP-flankiertes *KillerRed*, A) und der klonalen Tachyzoitenkultur des DiCre-Fd-Stammes (B) wurde für 8, 24, 36, 48, 72 oder 96 h mit Rapamycin behandelt, im Anschluss wurden die Zellen fixiert und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Die Zellen wurden am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome aufgenommen. A Die rot-fluoreszierenden Parasiten des Kontrollstammes DiCre-265 zeigten nach Rapamycin-Behandlung eine Exzision von *KillerRed* durch eine grüne Fluoreszenz an (ab 36 h). B Der DiCre-Fd-Stamm wurde mit dem α-Myc-Antikörper 1:4000 (Ziege-α-Maus Alexa Fluor® 546, 1:4000) gefärbt. Die hier abgebildete Aufnahme nach 24 h Induktion mit Rapamycin zeigt beispielhaft für alle Zeitpunkte die Detektion des Myc-markierten Fds. (Maßstabsbalken 5 µm)

zusätzlich eine Kontrollfärbung vorgenommen. Der Kontrollstamm zeigte beginnend nach 36 h ~20 % grün-fluoreszierende Parasiten, also die Exzision von *KillerRed* (siehe Abb. 17A). Zu späteren Zeitpunkten war ein zunehmend größerer Anteil mit bis zu ~70 % der Parasiten (nach 96 h) in den Vakuolen grün-fluoreszierend. Die eingesetzte Rapamycin-Konzentration scheint demnach zur Induktion der Exzision ausreichend zu sein. Die Parasiten des DiCre-Fd-Stammes hingegen zeigten zu keinem Zeitpunkt der unterschiedlichen Rapamycin-Behandlungszeiträume eine Fd Exzision durch grün-fluoreszierende Parasiten. Es war stets, wie auch ohne Rapamycin-Induktion (siehe Abb. 16), die Detektion des Myc-markierten Fds möglich (siehe Abb. 17B).

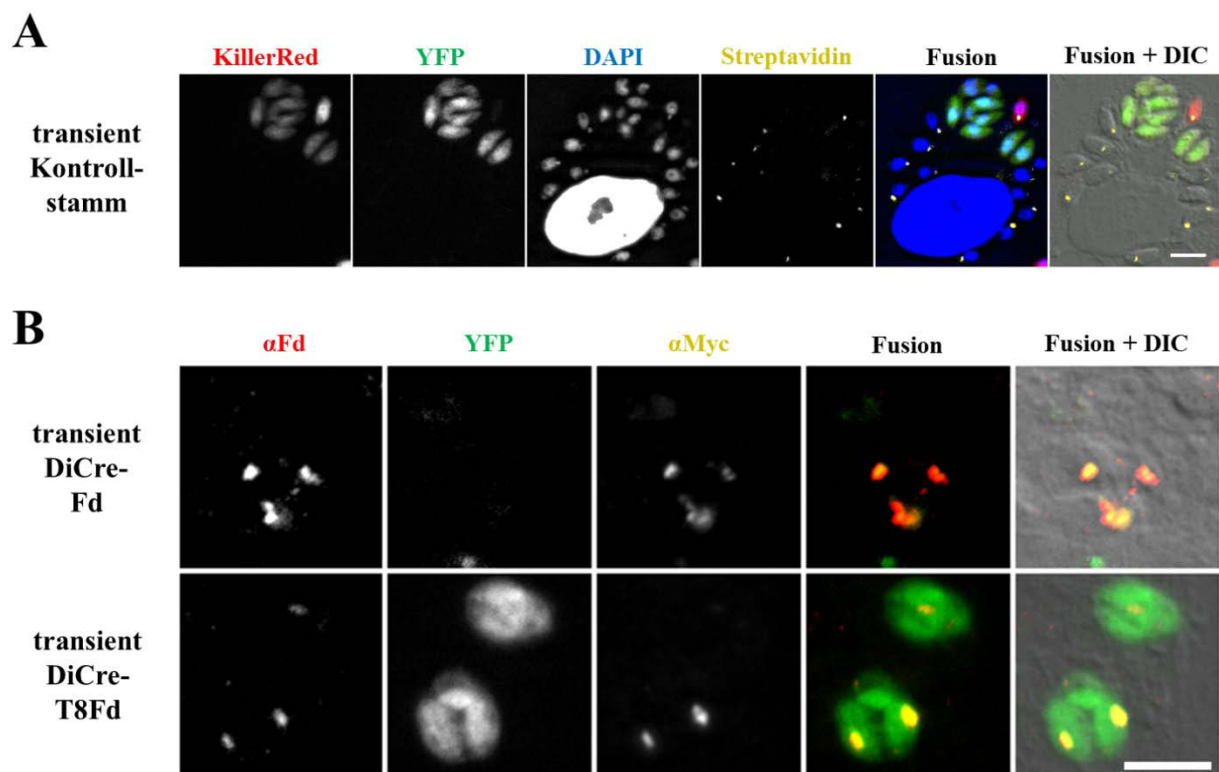
Die ausbleibende grüne Fluoreszenzfärbung der Rapamycin behandelten Parasiten der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion (DiCre-Fd) warf verschiedene Fragestellungen auf: Es galt zu klären, ob das loxP-flankierte Fd des DiCre Knockout-Konstruktes mit endogener Promoterregion (pG265-Fd) durch die Cre-Rekombinase exzisierbar ist. Es ist denkbar, dass nach stabiler Transfektion des Konstruktes die loxP-Stellen für die Cre-Rekombinase möglicherweise nicht mehr zugänglich sind. So erfolgte zum einen eine transiente Transfektion der beiden konstruierten Fd Knockout-Konstrukte (pG265-Fd, pG265-T8Fd) in den DiCre-Stamm und eine sich anschließende Rapamycin-Behandlung (siehe 4.2.3), zum anderen wurden beide Plasmide in einen Cre-Rekombinase exprimierenden Bakterienstamm transformiert (siehe 4.2.4). Weiterhin kann eine mangelnde Cre-Rekombinase Expression des DiCre-Fd-Stammes durch zufällige Mutationen in den Cre-Fusionsproteinen nicht ausgeschlossen werden, weshalb eine transiente Transfektion mit einem Cre-Rekombinase-exprimierenden Plasmid vorgenommen wurde (siehe 4.2.5). Schließlich ist es unklar, ob eine Fd Exzision in einem für die Expression und anschließender Detektion von YFP mittels Fluoreszenzmikroskopie ausreichendem Maße stattgefunden hat (siehe 4.2.5).

#### **4.2.3 Das Tub8-Promoter Fd Knockout-Konstrukt zeigt nach transienter Transfektion in *T. gondii* Fd Exzision**

Aufgrund der voraussichtlich zentralen Rolle des Ferredoxin-Redoxsystems (siehe 1.2.1) wurde zur Herstellung einer Fd Knockout-Mutante das Rapamycin-induzierbare DiCre-System verwendet (1.3). Die dazu generierten Konstrukte wurden stabil transfiziert, wobei von dem Konstrukt mit Tub8-Promoter keine korrekt integrierten Klone erhalten wurden und die andere Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion (siehe 4.2.1) keine grüne Fluoreszenz nach Rapamycin-Behandlung zeigte, was darauf hindeutet, dass keine



Fd Exzision stattfindet. Um zu überprüfen, ob der Fd-Genlokus mit dem loxP-flankierten Fd möglicherweise für die Cre-Rekombinase unzugänglich ist, wurden beide klonierten Knockout-Plasmide pG265-Fd bzw. -T8-Fd (siehe Tab. 15) mit jeweils loxP-flankiertem Fd und der endogenen Promoterregion bzw. dem Tub8-Promoter sowie das Kontrollplasmid pG265 (loxP-flankiertes *KillerRed*) transient in den DiCre-Stamm transfiziert. Bei einer transienten Transfektion wird kein Selektionsdruck angelegt, so dass vielfach Plasmid-DNA von den Parasiten aufgenommen wird, ohne dass diese in das Genom integrierte. Unmittelbar nach der Transfektion der jeweiligen Plasmide wurde Rapamycin zur Exzision des jeweiligen loxP-flankierten Gens zugesetzt und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert (48 und 72 h) und anschließend eine Kontrollfärbung vorgenommen. Nach 48 h waren beim



**Abb. 18: Rapamycin-Behandlung führt nach transienter Transfektion in der Fd Knockout-Mutante mit Tub8-Promoter zur Fd Exzision**

Die Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen (A und B) nach transienter Transfektion des Kontrollplasids und der Fd Knockout-Konstrukte (endogener Promoter, Tub8-Promoter) wurden nach 48 h Rapamycin-Behandlung fixiert und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Im Anschluss folgte die Antikörper- (B) und DAPI- (A und B) Färbung bevor die Dokumentation am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome vorgenommen wurde. **A.** Neben rot-fluoreszierenden Parasiten des transienten Kontrollstammes (loxP-flankiertes *KillerRed*) waren zudem grün-fluoreszierende Parasiten zu erkennen. **B** Die Zellen wurden mit dem  $\alpha$ -Fd-Antikörper 1:500 (Ziege- $\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor® 488, 1:1000) sowie dem  $\alpha$ -Myc-Antikörper 1:4000 (Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546, 1:4000) gefärbt. Obere Reihe: In dem transienten DiCre-Fd-Stamm waren sowohl Fd als auch Fd-Myc detektierbar, aber keine grüne Fluoreszenz sichtbar. Untere Reihe: Neben dem Fd- und Fd-Myc-Signal des transienten DiCre-T8Fd-Stammes waren grün-fluoreszierende Parasiten nachweisbar. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

transienten Kontrollstamm DiCre-265 neben nicht-transfizierten und transfizierten, noch rot-fluoreszierenden Parasiten bereits grün-fluoreszierende (= Exzision von *KillerRed*) Tachyzoiten auszumachen (siehe Abb. 18A). Nach 72 h nahm der Anteil der rot-fluoreszierenden zu Gunsten der grün-fluoreszierenden Parasiten ab. Ohne Rapamycin-Zugabe waren ebenfalls nicht-transfizierte Parasiten neben rot-fluoreszierenden, transfizierten Parasiten zu sehen (Daten nicht gezeigt). Neben der DAPI-Färbung zur Lokalisation doppelsträngiger DNA insbesondere der des Apicoplasten Genoms wurde zusätzlich ein biotinyliertes Protein im Apicoplasten (Acetyl-CoA-Carboxylase, Jelenska *et al.* 2001) mit Streptavidin-Cy5 gefärbt. Wie zu erwarten, kolokalisierten diese beiden Signale des Apicoplasten (siehe Abb. 18A). Durch das Zählen der insgesamt 65 vorhandenen Vakuolen und der 37 Vakuolen mit rot- bzw. grün-fluoreszierenden Parasiten aus drei zufällig gewählten Bildausschnitten wurde eine Transfektionseffizienz von 57 % bestimmt.

Die transiente Transfektion von pG265-Fd, dem Konstrukt mit endogener Fd Promoterregion, ergab erneut weder nach 48 h noch nach 72 h grün-fluoreszierende Parasiten, demnach keine Exzision von Fd. Da aber Fd-Myc-positive neben nicht-transfizierten Tachyzoiten detektiert werden konnten, muss die Transfektion erfolgreich gewesen sein. In allen Fd-Myc-positiven Parasiten kolokalisierte die Myc-Markierung mit dem endogenen Fd-Signal (siehe Abb. 18B, obere Reihe). In den Aufnahmen 48 h nach Transfektion unter Rapamycin-Induktion konnten sowohl Vakuolen der Fd-Myc positiven Parasiten mit zwei Parasiten, d.h. nach der ersten Replikation, detektiert werden als auch spätere Stadien nach drei bis fünf Verdopplungen (= 8-32 Parasiten, Daten nicht gezeigt).

Obwohl die stabile Transfektion des Plasmids pG265-T8Fd (Tub8-Promoter) zu keiner PCR-positiven klonalen Tachyzoitenkultur führte (siehe 4.2.1), konnten nach transients Transfektion des Plasmids sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Rapamycin-Behandlung vereinzelt Vakuolen mit grün-fluoreszierenden Parasiten (= Exzision von Fd; <10 % der transfizierten Parasiten) detektiert werden (siehe Abb. 18B, untere Reihe). Bei diesen Parasiten waren zudem stets das endogene Fd sowie das Fd-Myc-Signal nachweisbar. Demnach hat keine homologe Rekombination stattgefunden, was bei ausbleibendem Selektionsdruck nicht zu erwarten war. In den Vakuolen mit grün-fluoreszierenden Parasiten waren nach 48 h vielfach Parasiten nach der ersten Replikation auszumachen, wie in Abb. 18B (untere Reihe) zu sehen, aber auch Stadien nach vier bis fünf Verdopplungen mit 16-32 Parasiten (Daten nicht gezeigt). Das Tub8-Promoter-Plasmid scheint demnach im Gegensatz zum endogenen Promoterregion-Konstrukt funktional und eine Fd Exzision möglich.

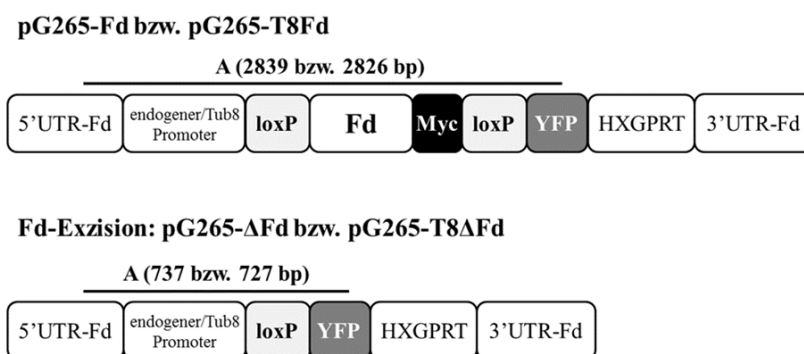
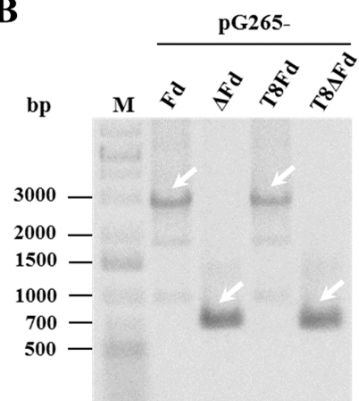
Die transiente Transfektion der Fd Knockout-Konstrukte und anschließende Rapamycin-Behandlung, d.h. die Induktion zur Exzision, lieferte nach 48 h, aber auch nach 72 h, lediglich für das Plasmid mit Tub8-Promoter (pG265-T8Fd) die zu erwartende grüne Fluoreszenzfärbung einiger der erhaltenen transfizierten Parasiten. Keiner der Fd-Myc positiven, transient transfizierten Parasiten des Plasmids mit endogener Promoterregion (pG265-Fd) zeigte eine grüne Fluoreszenz - weder nach 48 h noch nach 72 h Rapamycin-Induktion. Beide Plasmide unterscheiden sich lediglich im enthaltenen Promoter und sind vollständig und korrekt im relevanten Bereich (auch YFP) sequenziert. Das Plasmid pG265-T8Fd hat sich nach transients Transfektion zudem als funktional herausgestellt. Aus diesen genannten Gründen und der Tatsache, dass es eine klonale Tachyzoitenkultur der Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion vorliegt, soll durch die Transformation in einen DiCre-exprimierenden Bakterienstamm erneut überprüft werden, ob eine Exzision des loxP-flankierten Fd des pG265-Fd-Plasmids mit endogener Promoterregion ebenfalls möglich ist.

#### **4.2.4 In *E. coli* ist eine Fd Exzision durch die Cre-Rekombinase beider Fd Knockout-Konstrukte möglich**

Eine PCR-positive klonale Tachyzoitenkultur DiCre-Fd des stabil transfizierten Fd Knockout-Konstruktes mit endogener Promoterregion liegt vor; eine Rapamycin-Behandlung zur Induktion der Fd Exzision durch die Cre-Rekombinase führte jedoch anders als erwartet zu keiner grünen Fluoreszenz der Parasiten (siehe 4.2.1 und 4.2.2). Bei einem ebenfalls stabil transfizierten Kontrollstamm (DiCre-265), bei dem nach Rapamycin-Behandlung *KillerRed* herausgeschnitten werden soll, konnte hingegen eine grüne Fluoreszenz der Parasiten detektiert werden. In einer transienten Transfektion zeigte das Plasmid mit endogener Promoterregion ebenfalls keine grüne Fluoreszenz nach Rapamycin-Zugabe im Gegensatz zu dem Fd Knockout-Konstrukt mit Tub8-Promoter (siehe 4.2.3). Aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie, bei der pG265-Fd aus pG265-T8Fd hervorgegangen ist (siehe Tab. 15), ist bei pG265-Fd ebenfalls von der gleichen Funktionalität wie bei pG265-T8Fd auszugehen, da zudem die relevanten Regionen beider Plasmide sequenziert sind und sich keinerlei Mutationen in der Sequenz ergaben. Zur Überprüfung, ob eine Exzision des loxP-flankierten Fd auch im endogenen Promoterregion-Plasmid (pG265-Fd) möglich ist, erfolgte eine Transformation der Plasmide in einen Cre-Rekombinase exprimierenden *E. coli*-Stamm (*StrataClone SoloPack Competent Cells*). Es folgte eine Kolonie-PCR der erhaltenen Bakterienkulturen mit der Oligonukleotid-Kombination A, die

unterschiedliche PCR-Fragmentgrößen liefert, je nachdem ob eine Exzision stattgefunden hat oder nicht (siehe Abb. 19A). Es zeigte sich, dass Fd sowohl aus dem Plasmid pG265-Fd als auch aus dem Plasmid pG265-T8Fd durch die Cre-Rekombinase des verwendeten Bakterienstammes herausgeschnitten werden kann. Nach Fd Exzision ergibt sich bei pG265-Fd eine Bande mit einer Größe von 737 bp anstatt mit Fd von 2839 bp und bei pG265-T8Fd eine Bande mit einer Größe von 727 bp anstatt 2826 bp (siehe Abb. 19B).

Mit diesem von Steffen Zander durchgeführten Versuch (Robert Koch-Institut) konnte erstmals die Funktionalität des Fd Knockout-Konstrukts mit endogener Promoterregion nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses besteht die Vermutung, dass die in zwei Teilen als Fusionsproteine vorliegende Cre-Rekombinase des stabil transfizierten DiCre-Fd-Stammes möglicherweise teilweise mutiert ist und daher nicht die erforderliche Menge des Enzyms zur Exzision exprimiert wird. Ein Cre-Rekombinase exprimierendes Plasmid soll daher transient in den DiCre-Fd-Stamm transfiziert werden, um eine möglicherweise ausbleibende Tätigkeit der als zwei Fusionsproteine, in den Stamm integrierten Cre-Rekombinase zu ersetzen.

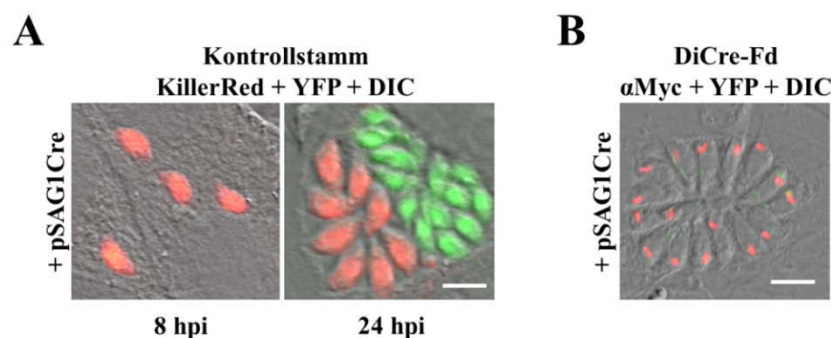
**A****B**

**Abb. 19: Fd Exzision durch die Cre-Rekombinase in *E. coli***

**A** Die Oligonukleotid-Bindungsstellen der Kombination A sind im Konstruktschema der Plasmide pG265-Fd bzw. pG265-T8Fd dargestellt sowie die zu erwartenden PCR-Produktgrößen. Die Größen der einzelnen Komponenten sind in Abb. 14 und Abb. 15 angegeben. **B** Nachweis über die Exzision von Fd nach Transformation des Plasmids pG265-Fd bzw. pG265-T8Fd in einen Cre-Rekombinase exprimierenden *E. coli*-Stamm durch eine analytische PCR-Reaktion mit Hilfe der Oligonukleotid-Kombination A durchgeführt von Steffen Zander, FG16, Robert Koch-Institut.

#### 4.2.5 Mangelnde Cre-Expression führt nicht zum Ausbleiben der Fd Exzision der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion

Der generierte, stabil transfizierte Fd Knockout-Stamm soll dazu dienen die voraussichtlich zentrale Funktion von Fd im Metabolismus des Apicoplasten zu untersuchen (1.2.1). Die durch Rapamycin bewirkte Dimerisierung der als zwei Fusionsproteine vorliegenden Cre-Rekombinase führte in der stabil transfizierte Fd Knockout-Mutante DiCre-Fd nicht zur Exzision des loxP-flankierten Fd, da mittels Fluoreszenz-Mikroskopie keine grüne Fluoreszenz detektiert werden konnte (siehe 4.2.2 und Abb. 9B). Mit Hilfe eines Cre-Rekombinase exprimierenden Bakterienstammes konnte jedoch gezeigt werden, dass zumindest auf Plasmidebene das loxP-flankierte Fd des endogenen Promoterregion-Plasmids herausgeschnitten werden kann. Da für die stabil transfizierte Fd Knockout-Mutante DiCre-Fd nicht ausgeschlossen werden kann, ob die in diesem Stamm enthaltene dimerisierbare Cre-Rekombinase funktionsfähig ist, wurde ein Plasmid mit zusätzlicher Cre-Rekombinase transient transfiziert. Die stabil transfizierte klonale Tachyzoitenkultur des Kontrollstammes (DiCre-265) diente dabei als Kontrolle. Nach der transienten Transfektion des Plasmids pSAG1-Cre wurden die Zellen nach unterschiedlich langer Infektionsdauer (8, 24, 36, 48, 72 h) fixiert und gefärbt. Bereits ab 24 h nach Transfektion der zusätzlichen Cre-Rekombinase war im Kontrollstamm die Exzision des *KillerReds* durch grün-fluoreszierende Parasiten



**Abb. 20: Eine zusätzlich transient transfizierte Cre-Rekombinase führt nicht zur Fd Exzision in der Fd Knockout-Mutante DiCre-Fd**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der klonalen Tachyzoitenkultur des Kontroll- (DiCre-265, loxP-flankiertes *KillerRed*, A) und des DiCre-Fd-Stammes (B) nach transienter Transfektion eines Plasmids (pSAG1-Cre) mit zusätzlicher Cre-Rekombinase und unterschiedlich langer Rapamycin-Behandlung (8, 24, 36, 48, 72 h) wurden die Zellen fixiert und mit BSA blockiert. Nach AK-Färbung (B,  $\alpha$ -Myc-Antikörper 1:4000, Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546 1:4000) wurden die Dokumentation am Zeiss Axio Imager Z1/Apotom durchgeführt. A Nach 24 h Induktion mit Rapamycin waren neben den rot-fluoreszierenden Parasiten des Kontrollstammes zudem grün-fluoreszierende Parasiten erkennbar. B Die hier abgebildete Aufnahme nach 36 h Induktion mit Rapamycin zeigt beispielhaft für alle Zeitpunkte die Detektion des Myc-markierten Fds, jedoch keine grün-fluoreszierenden Parasiten. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

ersichtlich (siehe Abb. 20A). Aufgrund der Annahme, dass die Parasiten einer Vakuole unmittelbar nach der Transfektion grün fluoreszieren, betrug die Transfektionseffizienz ~50 % von insgesamt 53 gezählten Vakuolen aus drei zufällig gewählten Bildausschnitten.

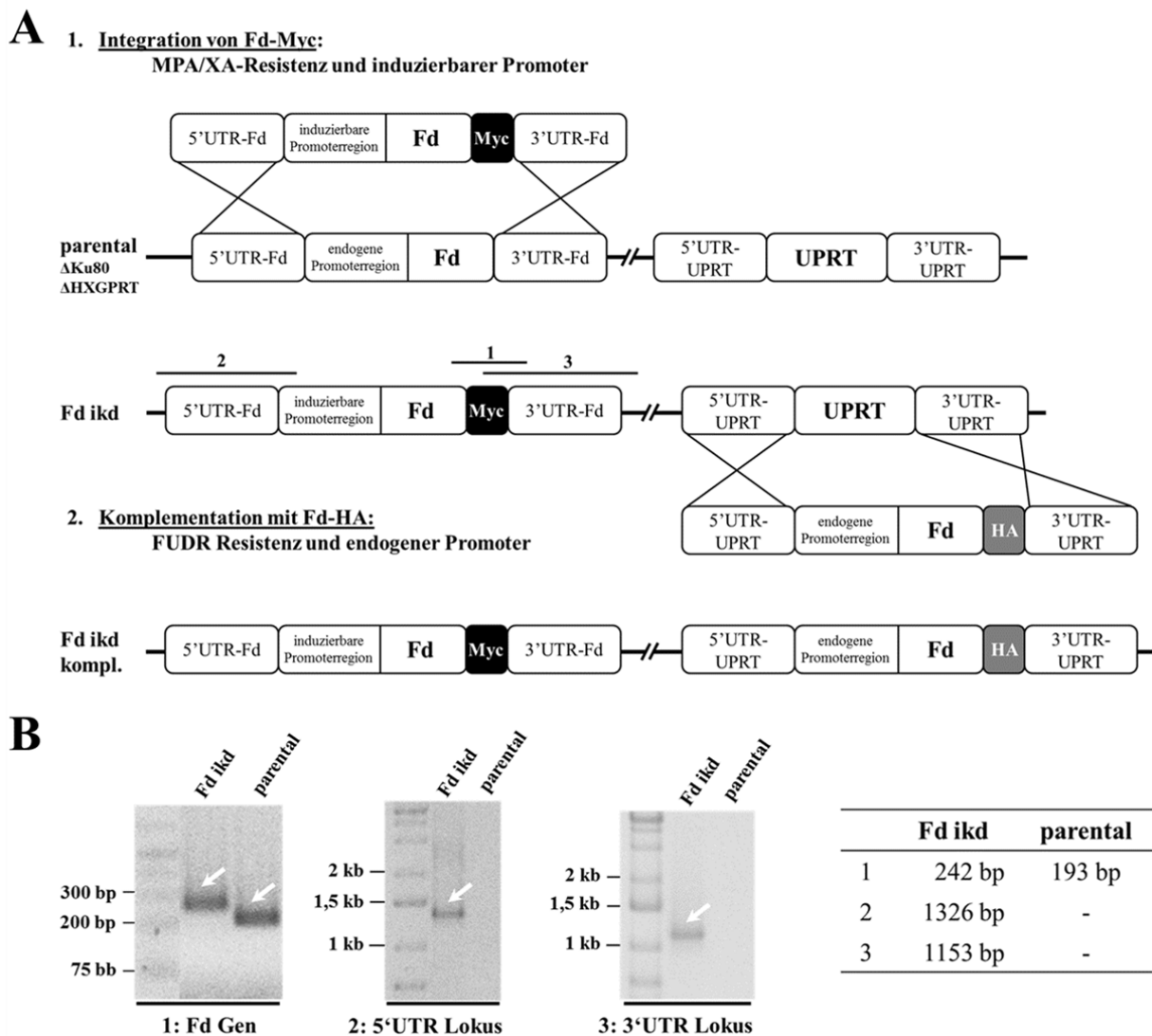
Die transiente Transfektion der Cre-Rekombinase in den DiCre-Fd-Stamm ergab zu keinem Zeitpunkt Fd Exzision, die durch grün-fluoreszierende Parasiten erkennbar gewesen wäre. Da das Fd Knockout-Konstrukt stabil in diesen Stamm integriert ist, konnte stattdessen zu jedem Zeitpunkt Myc-markiertes Fd detektiert werden (siehe Abb. 20B). Eine mutierte oder fehlerhafte Cre-Rekombinase der stabil transfizierten Fd Knockout-Mutante mit endogener Promoterregion (DiCre-Fd) kann nach diesem Versuch ausgeschlossen werden, da der Kontrollstamm vielfach die Exzision von KillerRed durch grün-fluoreszierende Parasiten zeigte. Es ist zum einen denkbar, dass der Fd-Genloкус im DiCre-Fd-Stamm durch eine spezifische Faltung des Genoms nicht für die Cre-Rekombinase zugänglich ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die nach der Fd Exzision exprimierte YFP Menge zur Detektion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nicht ausreichend ist. Da sich YFP von GFP lediglich durch eine Mutation unterscheidet, können die für GFP erhaltenen Ergebnisse direkt auf YFP angewandt werden (Wachter *et al.* 1998). So ist für GFP bekannt, dass schwache Promotoren nicht in der Lage sind die Autofluoreszenz einer typischen Säugerzelle durch die Expression einer erforderlichen Menge von 1  $\mu$ M korrekt gefaltetem GFP zu übertreffen (Cheng *et al.* 1996, Tsien 1998). Um zu überprüfen, ob der endogene Fd Promoter YFP in einer mit dem Fluoreszenz-Mikroskop nicht visualisierbaren Menge exprimiert, sollte ein  $\alpha$ -GFP-Antikörper eingesetzt werden, der gegebenenfalls bereits eine geringe Expression von YFP anzeigt (siehe 5.2).

#### **4.3 Konditionale Herabregulation der Ferredoxin Expression und deren Einfluss auf das Überleben von *Toxoplasma gondii***

##### **4.3.1 Erfolgreicher Austausch des endogenen Ferredoxin-Genabschnitts gegen ein induzierbares Ferredoxin-Knockdown Konstrukt**

In mehreren essentiellen Stoffwechselwegen nimmt das Ferredoxin-Redoxsystem voraussichtlich eine zentrale Rolle ein. Als einzig bekanntes Redoxsystem des Apicoplasten überträgt Fd vermutlich während der Isoprenoidvorstufen- als auch der Liponsäuresynthese Elektronen an verschiedene Metabolite (siehe 1.2). Um die zentrale Stellung von Fd zu untersuchen, sollte ein konditionaler Fd-Gen Knockdown mit dem Tetracyclin

(Tet)-induzierbaren System hergestellt werden, (siehe 1.3). Das Tet-induzierbare System zur Analyse von potentiell essentiellen Genen ist weit verbreitet, jahrelang erprobt und wird vielfach angewendet (Limenitakis und Soldati-Favre 2011). Bei einem Knockdown von Fd



**Abb. 21: Austausch des endogenen Ferredoxin-Genabschnittes gegen ein Tetracyclin-induzierbares Ferredoxin-Knockdown Konstrukt in *T. gondii***

**A** Schema des gezielten Fd Genaustauschs und der Komplementation durch doppelt homologe Rekombination sowie eine Übersicht der Konstrukte des Fd ikd- und des Fd ikd kompl.-Stammes. Das mit einer induzierbaren Promoterregion und einem Myc-Signal versehene Fd-Gen wird von jeweils einer 3' und 5'UTR flankiert und ersetzt das endogene Fd und seinen Promoter. Der Fd ikd-Stamm wird durch ein HA-markiertes Fd-Gen mit endogener Promoterregion am Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT)-Lokus durch entsprechende 3' und 5'UTR-Sequenzen komplementiert. Größen der Komponenten: 5'/3'UTR-Fd: ~1 kb; induzierbare Promoterregion: 4 kb; Fd: 1998 bp; Myc-Tag: 30 bp; endogene Promoterregion: 500 bp; 3'UTR-UPRT: 1 kb; UPRT: 4 kb; 5'UTR-UPRT: 3,8 kb; HA-Tag: 27 bp. **B** Nachweis über den Einbau des Fd ikd-Konstrukts am Fd-Genlokus durch analytische PCR-Reaktionen. Die Oligonukleotid-Bindungsstellen sind im Konstruktschema in A dargestellt; die zu erwartenden PCR-Produktgrößen sind in der Tabelle gelistet. Spezifische Banden sind im Gel durch Pfeile markiert.

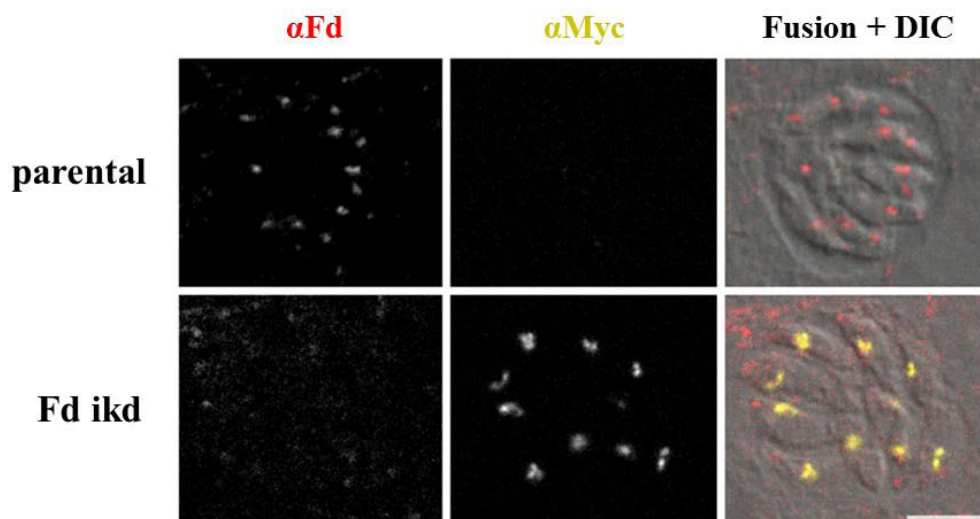
wird ein komplexer biochemischer Phänotyp erwartet. Der endogene Ferredoxin-Genabschnitt wurde durch eine Tet-induzierbare Promoterregion ausgetauscht (siehe 1.3, Meissner *et al.* 2002). Das erfolgreich generierte Plasmid pikoFd (siehe 3.1.5) enthält neben diesem Promoter, welcher dem Myc-markierten Fd vorgeschaltet ist, ein HXGPRT-Gen, das zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasiten genutzt wird. Zudem wird diese Sequenz jeweils von einer 1 kb langen 3' bzw. 5'UTR flankiert, die zur doppelt homologen Integration an den endogenen Fd-Genlocus benötigt werden. Das Plasmid piko-Fd wurde schließlich transfiziert (siehe 3.3.3) und mittels doppelt homologer Rekombination in den parental Stamm RHΔKUΔHX (siehe Tab. 8) integriert (siehe Abb. 21A oben). Eine MPA/XA Resistenz wird durch die Integration der HXGPRT-Gens in den parental Stamm ΔHXGPRT ermöglicht, so dass unmittelbar nach der Transfektion der Selektionsdruck angelegt wurde (siehe 3.3.3, Pfefferkorn und Borotz 1994, Donald *et al.* 1996). Nach der Selektion und Vereinzelung der Transfektanten wurde mit Hilfe verschiedener PCR-Reaktionen und der Verwendung geeigneter Oligonukleotid-Kombinationen (siehe 3.1.4) der erfolgreiche Austausch des endogenen Fd-Genabschnitts mit der Tet-induzierbaren Promoterregion und dem Myc-markierten Fd nachgewiesen (siehe Abb. 21B). Dementsprechend konnte als Bestätigung der Fd Myc-Markierung eine Bande mit einer Größe von 242 bp im Gegensatz zu dem nicht-markierten, endogenen Fd des parental Stammes RHΔKUΔHX mit einer PCR-Produktgröße von 193 bp detektiert werden. Die korrekte Integration sowohl abwärts als auch aufwärts vom induzierbaren Fd-Konstrukt konnte durch die Detektion einer Bande mit einer Größe von 1326 bzw. 1153 bp gezeigt werden. Nach Durchführung der verschiedenen PCR-Reaktionen konnte nachgewiesen werden, dass eine klonale Tachyzoitenkultur des induzierbaren Fd Knockdown-Stamm (Fd ikd) erfolgreich hergestellt werden konnte.

Um mögliche Effekte des Fd Knockdowns ausschließlich auf die Herabregulation von Fd zurückzuführen und nicht auf andere Bestandteile des Konstruktes, wurde mit einem HA-markierten Fd-Gen und endogener Promoterregion eine Komplementation des erhaltenen Fd ikd-Stammes vorgenommen. Die Komplementation des Fd ikd-Stammes erfolgte am Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT)-Genlocus durch die in das Plasmid pGRA-UPRT-Fd integrierten, entsprechend flankierenden 3' und 5'UTR-Sequenzen des UPRT-Gens (siehe Abb. 21A unten). Die stabile Integration an diesem Genort macht eine Selektion der transgenen Parasiten mit FUDR möglich: UPRT katalysiert die Reaktion von Uracil zu Uridin-Monophosphat, wohingegen der Umbau von Fluorouracil zu Fluorouridin zur Entstehung von Fluorodesoxyuridin-Monophosphat führt. Dies stellt einen Inhibitor der Thymidinsynthese dar und kann daher zur Selektion mit FUDR, welches intrazellulär zu



5-Fluorouracil metabolisiert wird, genutzt werden, da es die Identifikation derjenigen Parasiten erlaubt, bei denen das UPRT-Gen nicht mehr intakt ist. Ein aktives UPRT-Enzym ist für das Überleben der Parasiten nicht essentiell, da *T. gondii* auch *de novo* in der Lage ist Pyrimidin zu synthetisieren (Donald und Roos 1995). Nach Transfektion des Plasmids pGRA-UPRT-Fd konnte eine klonale Tachyzoitenkultur (Fd ikd kompl.) erhalten werden, die eine Resistenz gegenüber FUDR zeigte und dementsprechend den entsprechenden Abschnitt einschließlich HA-markierten Fd integriert hat. Der Immunfluoreszenz-mikroskopische Nachweis der Integration des HA-markierten Fd ist in Abb. 23 (dritte Reihe) dargestellt.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen konnte das endogene Fd des parentalen Stammes RH $\Delta$ KU $\Delta$ HX unter Verwendung des polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serums nachgewiesen werden (siehe Abb. 22, oben links), nicht jedoch das Myc-markierte Fd aus dem Fd ikd-Stamm analog dem Knockout-Stamm DiCre-Fd (siehe 4.2.1 und Abb. 16). Dort ist eine Detektion von Fd ausschließlich mit dem  $\alpha$ -Myc-Antikörper möglich (siehe Abb. 22, mittleres Bild). Das polyklonale  $\alpha$ -Fd-Serum ergab insbesondere bei der hier abgebildeten Aufnahme des Fd ikd-Stammes eine sehr hohe Hintergrund-Färbung. Da die Färbung nicht mit der Myc-Färbung kolokalisiert werden konnte (siehe Abb. 22, unten links), handelt es sich nicht um eine spezifische Färbung. Neben der eindeutigen Fd Färbung im parentalen Stamm, ist zudem auch hier eine Hintergrund-Färbung auszumachen (siehe Abb. 22, oben links). Die Kolokalisation der erhaltenen Fd-Signale, sowohl des Fd ikd- als auch des parentalen



**Abb. 22: Detektion des Myc-markierten Fd in der Fd Knockdown-Mutante**

Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des Fd ikd- und des parentalen Stammes (RH $\Delta$ KU $\Delta$ HX). Nach 24 h Infektion wurden die Zellen fixiert und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Die Zellen wurden mit dem  $\alpha$ -Fd-Antikörper 1:500 (Ziege- $\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor® 488, 1:1000) sowie dem  $\alpha$ -Myc-Antikörper 1:4000 (Ziege- $\alpha$ -Maus Dylight® 650, 1:1000) gefärbt und am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome detektiert. Ein repräsentativer Versuch von drei Wiederholungen ist dargestellt. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

Stammes, wurde mit Hilfe der DAPI gefärbten, doppelsträngigen DNA vorgenommen. Wegen hoher aufgetretener Hintergrund-Färbung, werden diese Aufnahmen hier nicht gezeigt. Wie bei dem Myc-markierten Fd des Fd ikd-Stammes als auch des Knockout-Stammes DiCre-Fd, konnte zudem das zur Komplementation eingebrachte HA-markierte Fd des Fd ikd kompl. nicht mit dem polyklonalen  $\alpha$ -Fd-Serum detektiert werden, sondern lediglich mit einem  $\alpha$ -HA-Antikörper (Daten nicht gezeigt, siehe auch 4.2.1).

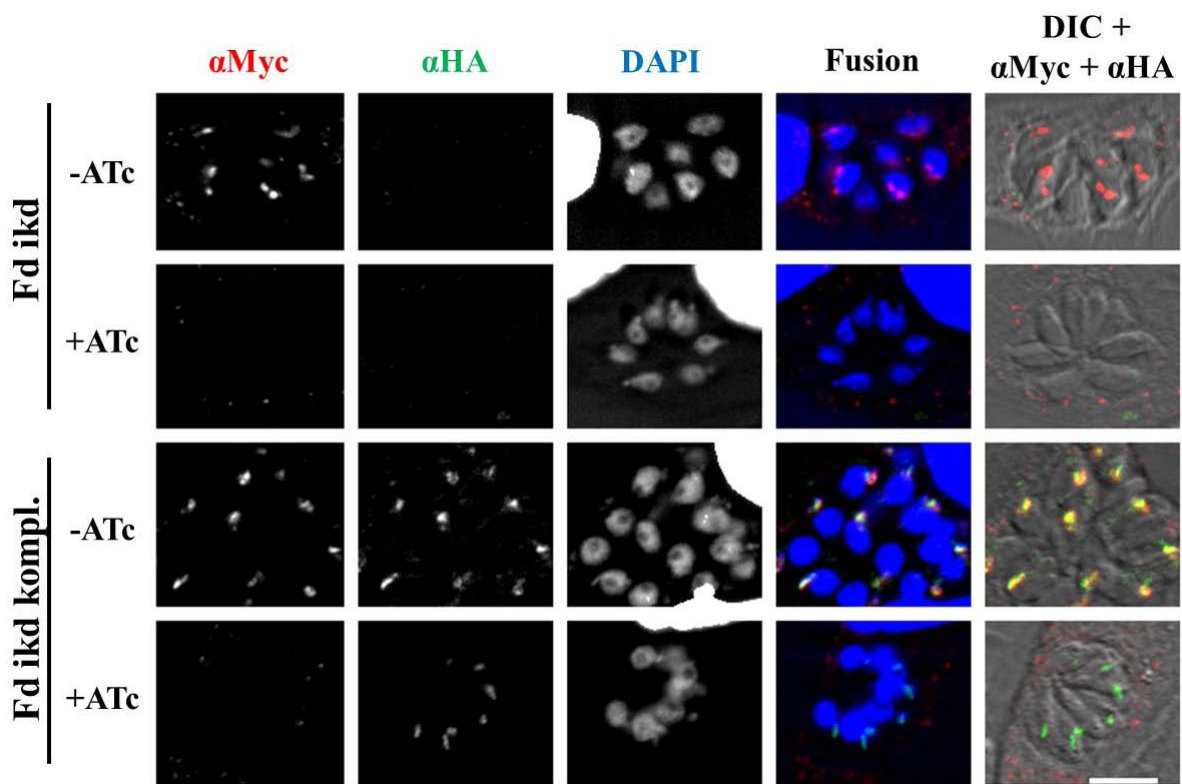
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl ein induzierbarer Fd Knockdown-Stamm (Fd ikd) als auch ein komplementierter Fd ikd kompl.-Stamm erfolgreich generiert werden. Unter Verwendung von PCR-Reaktionen konnte die korrekte Integration der induzierbaren Promoterkassette gezeigt werden. Der Austausch von endogenem Fd durch Myc-markiertes Fd des Fd ikd-Stamm wurde zudem mit Hilfe Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen. Inwiefern eine Induktion mit ATc zur Herabregulation der Fd-Expression führt und welche Auswirkungen das hat, galt es in den folgenden Untersuchungen zu analysieren.

#### **4.3.2 Tetracyclin bewirkt eine Herabregulation der Fd-Expression in der Fd Knockdown-Mutante**

Die zentrale Stellung des Ferredoxin-Redoxsystems soll mit Hilfe eines konditionalen Knockdowns untersucht werden, bei dem der endogene Fd-Genlocus gegen ein Myc-markiertes Fd und ein Tet-induzierbares Promotersystem ausgetauscht wurde und so der Fd ikd-Stamm entstanden ist (siehe 4.3.1). Durch eine Induktion des Fd ikd-Stammes mit Tetracyclin oder -derivaten soll die Fd-Expression verhindert werden (siehe Abb. 8B) und mit Hilfe von Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen sichtbar gemacht werden. Der Fd ikd- und der komplementierte Knockdown-Stamm (Fd ikd kompl.) wurden mit ATc induziert und anschließend eine Immunfluoreszenz-Färbung mit einem  $\alpha$ -Myc- und einem  $\alpha$ -HA-Antikörper durchgeführt. Zur Induktion wurde eine ATc-Konzentration von 0,6  $\mu$ g/ml verwendet, die zuvor durch Titration in Vorversuchen ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Nach zweitägiger ATc-Induktion war Fd im Fd ikd-Stamm mit Hilfe des  $\alpha$ -Myc-Antikörpers nicht mehr nachweisbar (Abb. 23, zweite Reihe). Wurde der Fd ikd-Stamm weniger als 48 h mit ATc induziert war stets eine Detektion des Myc-Tags möglich, wenn auch mit einem schwächeren Signal als im uninduzierten Zustand (Daten nicht gezeigt). Der komplementierte Fd ikd-Stamm zeigte ohne Induktion sowohl ein Myc- als auch ein HA-Signal (Abb. 23, dritte Reihe), die, wie in der Fusionsaufnahme deutlich durch das gelbe Signal ersichtlich, kolokalisierten. Nach zweitägiger ATc-Induktion war die Myc-Markierung des Fd ikd

kompl.-Stammes, wie erwartet auch hier nicht mehr nachweisbar. Der HA-Tag des zur Komplementierung eingebrachten Fds am UPRT-Lokus blieb jedoch weiterhin detektierbar (Abb. 23, untere Reihe). Das erhaltene Fd-Signal durch die Myc- oder HA-Markierung des Fd *ikd*- und Fd *ikd* kompl.-Stammes kolokalisierte mit der DAPI-gefärbten doppelsträngigen DNA des Apicoplasten, wie in den Fusionsaufnahmen gezeigt.

Eine ATc-Induktion von 48 h des Fd *ikd*- und Fd *ikd* kompl.-Stammes führt demnach zu einer Herabregulation der Fd-Expression, so dass eine Detektion des Myc-markierten Fd in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen ausblieb. Mit Hilfe der folgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, welche Auswirkungen die Repression der Fd Expression auf das Parasitenwachstum, die Replikation oder auch die Fortbewegung hat.



**Abb. 23: Regulation der Tetracyclin-induzierbaren Fd Knockdown-Mutante**

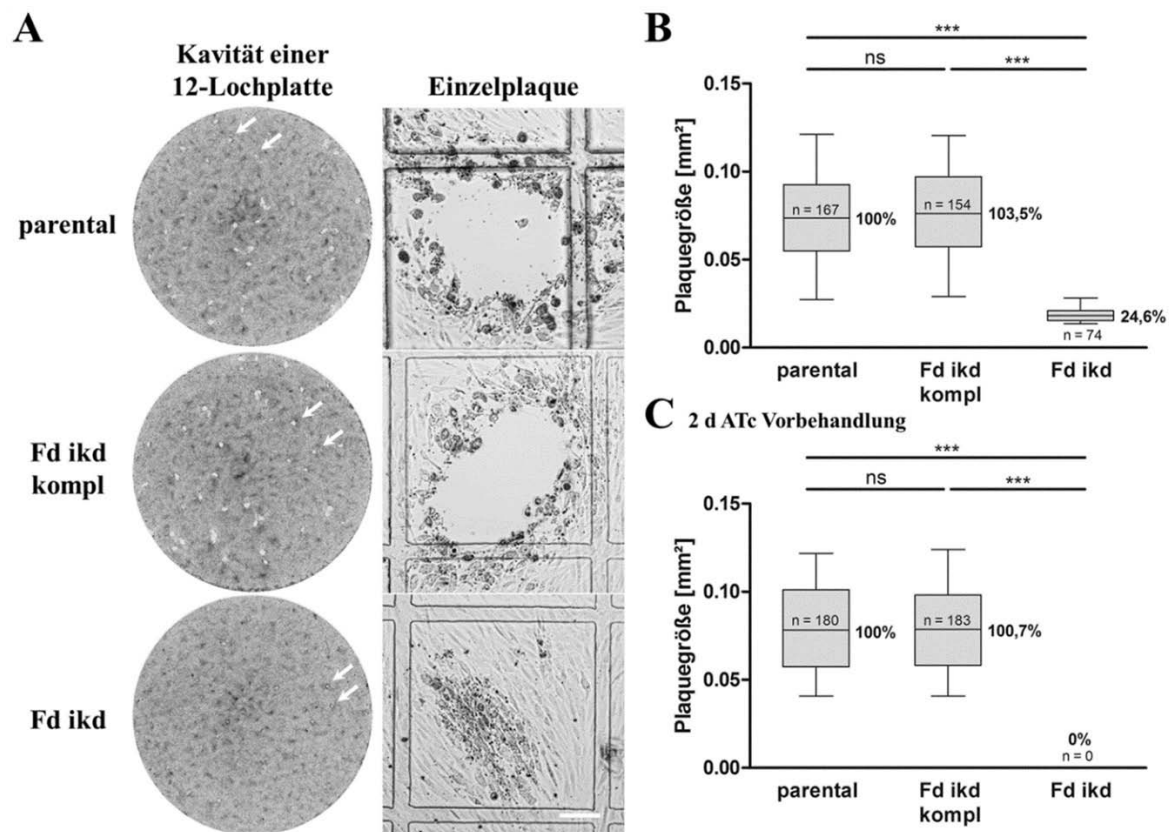
Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des Fd *ikd*- und des komplementierten Fd *ikd*-Stammes. Nach 48 h Induktion mit ATc wurden die Zellen fixiert und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Die Zellen wurden mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper 1:100 (Ziege- $\alpha$ -Ratte Alexa Fluor® 488, 1:1000) sowie dem  $\alpha$ -Myc-Antikörper 1:4000 (Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546, 1:4000) und DAPI gefärbt und am Zeiss Axio Imager Z1/Apoptome detektiert. Ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

### 4.3.3 Die Herabregulation der Ferredoxin-Expression führt zu einer ausgeprägten Reduktion des Parasitenwachstums

Nachdem eine konditionale Fd Knockdown Mutante (Fd ikd) erfolgreich hergestellt werden konnte (siehe 4.3.1) und zudem eine ATc-Induktion zur Herabregulation des Myc-markierten Fd führte (siehe 4.3.2), sollte der Einfluss der Fd Repression auf das Wachstum der Parasiten untersucht werden. *T. gondii* durchläuft während des Wachstums einen sogenannten lytischen Zyklus, dessen Dauer in der Regel 48–56 h beträgt. In dieser Zeit invadiert ein Parasit eine Wirtszelle, repliziert sich in dieser und tritt schließlich durch Wirtszelllyse wieder heraus, um dann erneut umliegende Zellen zu infizieren (siehe Abb. 25A). Nach sieben Tagen Laufzeit eines Plaqueassays, was ungefähr drei lytischer Zyklen entspricht, entstehen sogenannte Plaques im Wirtszellrasen, die als Löcher im sonst intakten konfluenten Wirtszellrasen erkennbar werden. Ein Plaque ergibt sich demnach im Idealfall nach der Infektion ursprünglich nur eines einzelnen Parasiten. Die Infektionsrate ist dabei sehr gering zu wählen. Das Vermessen einzelner Plaques ist nach Anfärben des Wirtszellrasens mit Kristallviolett möglich. Je nach gewählten Bedingungen treten die Plaques in unterschiedlicher Anzahl und Größe auf. Eine 12-Lochplatte mit konfluent gewachsenen Wirtszellen wurde mit den jeweiligen Parasitenstämmen (Fd ikd, Fd ikd kompl., parental) mit und ohne ATc-Induktion für sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Induktion wurde eine ATc-Konzentration von 0,6 µg/ml verwendet, die zuvor durch Titration in Vorversuchen ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Ohne Induktion unterschied sich die Anzahl und die Größe der Plaques aller eingesetzten Stämme (Fd ikd, Fd ikd kompl., parental) unwesentlich (Daten nicht gezeigt). Nach einer ATc-Behandlung von 7 d blieben die Anzahl und Größe der Plaques des parentalen als auch des Fd ikd kompl.-Stammes vergleichbar, weshalb diese als Bezugsgrößen verwendet wurden (n = 167 bzw. 154, siehe Abb. 24A und B). Für den Fd ikd-Stamm wurden dagegen ungefähr halb so viele Plaques (n = 74) in der Kavität einer 12-Lochplatte sichtbar (siehe Abb. 24A und B). Zudem waren im Zellrasen des Fd ikd-Stammes in einer 400fachen Vergrößerung vielfach keine Plaques, sondern lediglich infizierte Bereiche auszumachen (Abb. 24A, rechts). Nach siebentägiger Induktion reduzierte sich auch die Plaquegröße des Fd ikd-Stammes signifikant, um ungefähr 75 % im Vergleich zum ebenfalls induzierten parentalen sowie Fd ikd kompl.-Stamm (siehe Abb. 24B). Der komplementierte Fd ikd-Stamm (Fd ikd kompl.) zeigte nach Induktion eine dem parentalen Stamm vergleichbare Größe der Plaques. Wurde die Fd Knockdown Mutante (Fd ikd) vor dem Ansetzen des Plaqueassays 2 d mit ATc vorbehandelt, ergaben sich nach 7 d Assaylaufzeit keine Plaques und konnten demnach nicht vermessen werden (siehe Abb. 24C). In einer

400fachen Vergrößerung waren jedoch wenige infizierte Bereiche sichtbar (Daten nicht gezeigt). Bei dem parentalen bzw. dem Fd ikd kompl.-Stamm konnten, wie bei ausbleibender ATc-Vorbehandlung, ähnlich große und vergleichbar viele Plaques gemessen werden ( $n = 180$  bzw.  $n = 183$ , siehe Abb. 24C).

Der Fd ikd-Stamm zeigte im Vergleich zum parentalen Stamm und der komplementierten Fd Knockdown Mutante eine ausgeprägte Wachstumsinhibition nach siebentägiger ATc-Induktion im Plaqueassay. Dieser Effekt verstärkte sich sogar bei zweitägiger ATc-Vorbehandlung der Fd Knockdown Mutante. Um zu klären, ob die Wachstumsinhibition durch eine verlangsamte Replikation des Parasiten herrührt, wird im Folgenden in einem Replikationsassay die Parasitenverdopplung über die Parasitenzahl in den Vakuolen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

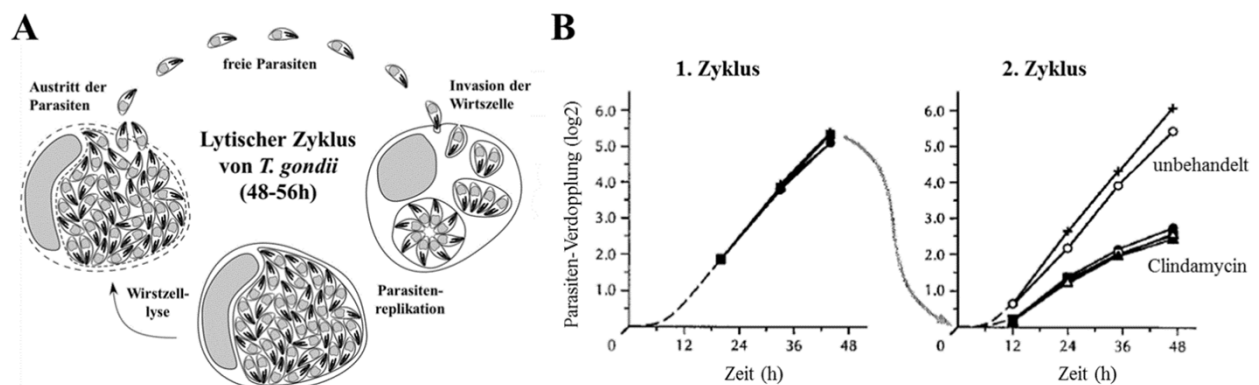


**Abb. 24: Ausgeprägte Wachstumsinhibition des Fd ikd-Stammes nach ATc-Induktion im Plaqueassay**

**A** Aufnahmen der Kavitäten (Ø 24,1 mm) einer 12-Lochplatte nach 7 d Laufzeit (+ATc) eines Plaqueassays und anschließender Kristallviolett-Färbung. Die weißen Stellen (Plaques, Pfeile) geben die Bereiche an, in denen durch die Infektion eines Parasiten der jeweiligen Stämme Löcher im Wirtszellrasen entstanden sind. Mit Hilfe einer 400fachen Vergrößerung am AxioObserver.Z1 wurden Einzelplaques eines Plaqueassays, in  $\mu$ -dish-Zellkulturschalen durchgeführt, aufgenommen. (Maßstabsbalken 100  $\mu$ m) **B und C** Die Plaques wurden mit Hilfe des Plugins *Count\_Plaques\_Toolbox\_7* vermessen und der Median aller vermessenen Einzelplaques aus drei unabhängigen biologischen Replikaten für den parentalen, Fd ikd- und Fd ikd kompl.-Stamm aufgetragen. Die Daten sind als Box Plot mit Tukey-Style Whiskers dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage einer One-way ANOVA-Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ; ns nicht signifikant)

#### 4.3.4 ATc-Induktion verursacht eine verlangsamte Replikation des Fd ikd-Stammes

In einem Plaqueassay konnte nach ATc-Induktion eine starke Wachstumsinhibition der Fd Knockdown Mutante festgestellt werden (siehe 4.3.3). Um den Replikationsprozess des Fd ikd-Stammes während des in Abb. 25A dargestellten lytischen Zyklus unter ATc-Behandlung zu beschreiben, wurde die Verdopplungszahl der Parasiten innerhalb der parasitophoren Vakuole während des ersten, zweiten und dritten lytischen Zyklus ermittelt. Bei Behandlung mit Ciprofloxacin, Clindamycin oder Chloramphenicol (CAM) zeigt *T. gondii* einen sogenannten *delayed death*-Phänotyp, bei dem die Verdopplungszahl im ersten Zyklus unverändert bleibt; ab dem zweiten lytischen Zyklus beginnt diese sich jedoch zu reduzieren bis die Parasiten schließlich in den folgenden Zyklen absterben (siehe Abb. 25B, Kim *et al.* 1993, Fichera *et al.* 1995, Fichera und Roos 1997). Da es zu klären gilt, ob eine Herabregulation der Fd-Expression einen *delayed death*-Phänotyp verursacht, wurde der Fd ikd-Stamm zudem zur Kontrolle mit CAM behandelt. Zur Bestimmung der Verdopplungszahl wurden die Parasiten nach jedem Zyklus (alle 48 h) mechanisch vereinzelt und für jeden weiteren Zyklus zur Infektion zu neuen Wirtszellen mit der entsprechenden Behandlung gegeben. Während der jeweiligen Zyklen wurde alle 12 h die Anzahl der Parasiten pro Vakuole pro Bedingung von mindestens 50 parasitophoren Vakuolen bestimmt. Die Behandlung des Fd ikd-Stammes mit Pyrimethamin als letale Wirkstoff-Kontrolle führte bereits im ersten Zyklus zum Absterben der Parasiten (Daten nicht gezeigt).



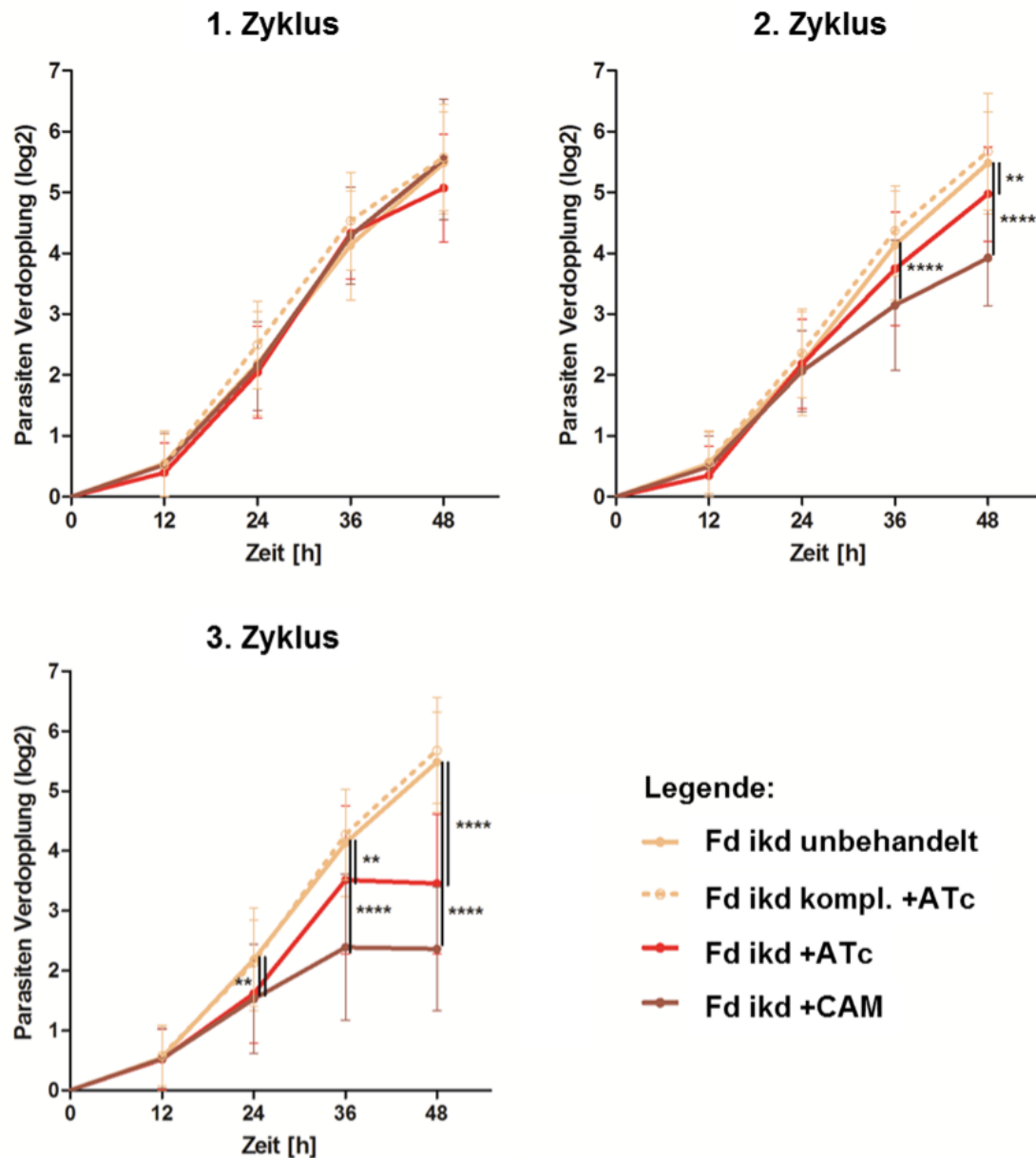
**Abb. 25: Lytischer Zyklus und *delayed death*-Phänotyp von *T. gondii***

**A** Schematische Darstellung des lytischen Zyklus von *T. gondii*. Ein Parasit invadiert eine Zelle, repliziert sich in dieser und tritt schließlich nach 48-56 h durch Wirtszelllyse aus dieser wieder heraus (1. Zyklus). Die freigesetzten Parasiten können erneut Zellen infizieren und der Zyklus beginnt von neuem (2. Zyklus). Abb. verändert entnommen von <https://www2.bc.edu/~gubbelsj/Toxoplasma.html>, 12.05.2015, 12.15 Uhr. **B** Verlauf der Graphen bei *delayed death*-Phänotyp. Die Behandlung von *T. gondii* mit Clindamycin (aber auch Chloramphenicol) führt ab dem zweiten lytischen Zyklus im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle zu einer reduzierten Verdopplung der Parasiten; in den weiteren 2-3 Zyklen schließlich zum Absterben der Parasiten. Abb. verändert entnommen von Fichera *et al.* 1995.

Es stellte sich heraus, dass die ermittelten Verdopplungszahlen für jeden Zeitpunkt des ATc-behandelten parentalen als auch des Fd ikd kompl.-Stammes in allen Zyklen zu denen ohne ATc-Induktion vergleichbar waren, weshalb in den Graphen neben der Fd Knockdown Mutante lediglich die Verdopplungszahlen des ATc-induzierten Fd ikd kompl.-Stammes zum Vergleich aufgetragen sind (siehe Abb. 26). Der Fd ikd-Stamm zeigte ohne Induktion in allen ermittelten Zyklen ein ähnlichen Verlauf der Graphen, also eine vergleichbare Replikationsrate, wie der des komplementierten Fd ikd-Stammes (siehe Abb. 26). So verdoppelte sich die Parasitenzahl pro Vakuole ungefähr alle 8 h bis die Parasiten nach 48-56 h die Wirtszelle lysierten. Dies geschah ab einer Parasitenanzahl von  $64 (2^6)$  –  $128 (2^7)$ , selten bei  $256 (2^8)$ , was in den Aufnahmen durch extrazelluläre Tachyzoiten erkennbar war. Unter ATc-Behandlung hat sich die Verdopplung der Parasiten des Fd ikd-Stammes innerhalb des ersten Zyklus lediglich nach 48 h unwesentlich verringert (nicht signifikant, siehe Abb. 26, 1. Zyklus). Im zweiten Zyklus unter ATc-Behandlung ist eine Verlangsamung der Verdopplung des Fd ikd-Stammes bereits nach 36 h auszumachen, jedoch auch hier noch nicht signifikant. Nach 48 h war die Replikationsrate hingegen um 9 % signifikant verringert im Vergleich zum unbehandelten Fd ikd-Stamm (siehe Abb. 26, 2. Zyklus). Während des dritten Zyklus unter ATc-Induktion wies der Fd ikd-Stamm bereits nach 24 h eine signifikant um 26 % geringere Parasiten-Verdopplung im Vergleich zum unbehandelten Fd ikd-Stamm auf. Nach 36 h betrug die Verlangsamung der Replikationsrate knapp 15 % und stieg nach 48 h auf 37 % im Vergleich zum unbehandelten Fd ikd-Stamm an. Die Anzahl der Parasiten pro Vakuole blieb nach 36 h und 48 h annähernd konstant (siehe Abb. 26, 3. Zyklus).

Der mit CAM als *delayed death*-Phänotyp Kontrolle behandelte Fd ikd-Stamm zeigte im ersten Zyklus, wie erwartet, keine Verringerung der Verdopplungszahl (siehe Abb. 26, 1. Zyklus). Im zweiten Zyklus ab 36 h war eine um 24 % signifikant reduzierte Replikationsrate im Vergleich zum unbehandelten Fd ikd-Stamm auszumachen, die nach 48 h weiterhin reduziert blieb (28 %, siehe Abb. 26, 2. Zyklus). Die CAM behandelten Parasiten des Fd ikd-Stammes zeigten im dritten Zyklus nach 24 h eine um 30 % signifikante Reduktion der Verdopplungsrate, sowohl nach 36 h als auch nach 48 h war diese mit 42 % und 57 % im Vergleich zum ATc-behandelten Fd ikd-Stamm weiter verringert (siehe Abb. 26, 3. Zyklus).

Die durch ATc-Induktion bewirkte Herabregulation von Fd verursachte ab dem zweiten Zyklus eine leicht verlangsamte Replikation (9 %), ab dem dritten Zyklus setzt diese bereits früher ein und ist mit bis zu 37 % stärker ausgeprägt. Dass eine Auswirkung auf die Replikation erst ab dem zweiten Zyklus zu beobachten ist, steht im Einklang mit dem erst nach 48 h ausbleibenden Fd Myc-Signal in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen



**Abb. 26: Der Fd ikd-Stamm zeigt ab dem dritten Zyklus unter ATc-Behandlung eine deutlich verringerte Replikation**

Die Bestimmung der Parasitenzahl pro Vakuole wurde für die jeweiligen Stämme (Fd ikd, Fd ikd kompl.) und Bedingungen (unbehandelt, ATc- oder CAM-Behandlung) alle 12 h vorgenommen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Parasiten-Verdopplung ( $\log_2$ ) ist gegen die Zeit für die Stämme Fd ikd (unbehandelt, +ATc, +CAM) sowie Fd ikd kompl. (+ATc) aufgetragen. Die Anzahl der Parasiten-Verdopplung nach der Infektion mit den Tachyzoiten-Stämmen wurde als  $\log_2$  (Parasitenanzahl/Vakuole) angegeben, da sich die Tachyzoiten innerhalb einer Vakuole synchron replizieren (Fichera *et al.* 1995). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für jeden Zeitpunkt und jeden Stamm aus mindestens 50 parasitophoren Vakuolen zufällig gewählter Bildausschnitte berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage einer *Two-way* ANOVA-Analyse mit anschließendem *Bonferroni-Test* (\*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ ; ohne weitere Angabe entspricht „nicht signifikant“)



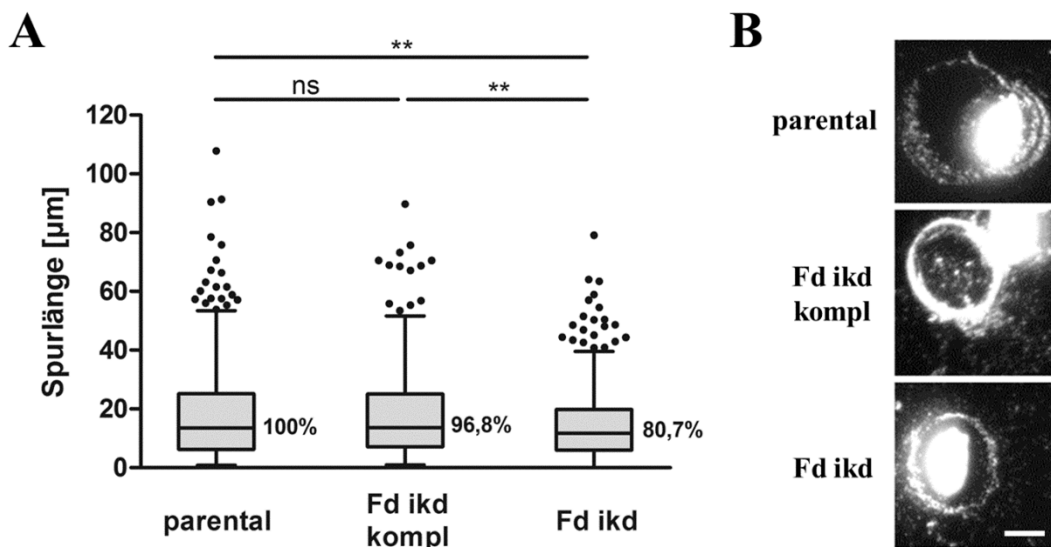
(siehe 4.3.2). Die *delayed death*-Phänotyp Kontrolle (CAM-Behandlung) zeigte insgesamt eine stärkere Reduktion der Replikationsrate auf. Zudem wirkten die Parasiten im dritten Zyklus unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den ATc-induzierten Parasiten in den Aufnahmen merklich beeinträchtigt: Die parasitophoren Vakuolen waren kleiner und die Parasiten selbst hatten zudem eine kleinere, abnorme Form (Daten nicht gezeigt). Demnach verursacht eine Fd-Repression keinen *delayed death*-Phänotyp, jedoch eine reduzierte Replikationsrate der Parasiten insbesondere nach fünftägiger ATc-Induktion. Lichtmikroskopisch konnte keine morphologische Änderung der Fd Knockdown Mutante ausgemacht werden, was im Folgenden durch Elektronenmikroskopische Aufnahmen näher untersucht wurde.

#### **4.3.5 Verringerte Motilität als Folge einer beeinträchtigten Isoprenoidsynthese der Fd Knockdown Mutante**

Wie in 1.2.2 beschrieben, besteht eine direkte Verbindung des Ferredoxin-Redoxsystems zur Isoprenoidsynthese: So fungiert Fd zumindest in *P. falciparum* als Elektronendonator in den letzten beiden Syntheseschritten der Isoprenoidvorstufen und liefert Elektronen an LytB und voraussichtlich GcpE (Rohrich *et al.* 2005). Kürzlich wurde festgestellt, dass das Ausbleiben der Isoprenoidsynthese zu einer massiven Beeinträchtigung der Motilität von *T. gondii* führt, was die Folge des Verlusts der N-Glykosylierung des GAP50-Proteins sein soll (Vortrag B. Striepen „Using genetics to study *Toxoplasma* and *Cryptosporidium*“, *International Congress of Coccidiosis 2014*, Dresden). Das N-glykosylierte GAP50-Protein ist eine wichtige Komponente des Multiprotein-Komplexes der Gleit-Fortbewegung und somit verantwortlich für eine einwandfreie Motilität von *T. gondii* (Fauquenoy *et al.* 2011). Ob die Fd Knockdown Mutante nach ATc-Induktion und somit der Fd Herabregulation eine verringerte Motilität zeigt, die neben der festgestellten verlangsamten Replikation zu kleineren Plaques im Plaqueassay geführt haben könnte, soll mit Hilfe eines Motilitätsassay ermittelt werden. *T. gondii* hinterlässt bei der Fortbewegung eine Spur aus sekretierten Oberflächenprotein SAG1 (Hakansson *et al.* 1999), welches mit einem  $\alpha$ -SAG1-Antikörper (DG52) angefärbt werden kann. Im Anschluss wurden die Aufnahmen verblindet und die Spuren vermessen. Da das Signal des Myc-markierten Fd erst nach 48 h ATc-Induktion nicht mehr nachweisbar war und die Replikation insbesondere nach 4 d ATc-Behandlung reduziert war (siehe 4.3.2 und 4.3.4), wurden der Fd ikd-, der Fd ikd kompl.- sowie der parentale Stamm einer viertägigen Vorbehandlung mit ATc unterzogen. Alle Stämme wurden zudem ohne Behandlung untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl die unbehandelten

(Fd ikd, Fd ikd kompl., parental) als auch der ATc-induzierte parentale und komplementierte Fd ikd-Stamm einen vergleichbaren Median der Spurlänge zeigten. In Abb. 27A sind daher nur die erhaltenen Werte der Spurlängen aller Stämme nach ATc-Behandlung (4 d) dargestellt. Der Fd ikd-Stamm zeigte nach 4 d ATc-Induktion einen um etwa 20 % reduzierten Median der Spurlänge im Vergleich zum parentalen und auch zum Fd ikd kompl.-Stamm (Abb. 27A). Beispielhaft sind Aufnahmen der vermessenen Spuren aller induzierten Stämme in Abb. 27B dargestellt; diese ließen ohne Vermessung keinen Schluss auf eine mögliche Verkürzung der Spuren der Fd Knockdown Mutante zu.

Die Bestimmung der Motilität durch Vermessen der Spuren des Fd ikd-Stammes zeigte einen um 20 % reduzierten Median der Spurlänge im Vergleich zum komplementierten Fd ikd- und parentalen Stamm. Demnach scheint die Herabregulation der Fd-Expression zu einer verringerten N-Glykosylierung des GAP50-Proteins durch einen Einfluss auf die Isoprenoidvorstufen-Synthese geführt zu haben, was sich in einer verkürzten Spurlänge niederschlug.



**Abb. 27: Ein Fd Knockdown führt zu einer verringerten Motilität**

**A** Der Motilitätsassay der Stämme (parental, Fd ikd kompl., Fd ikd) wurde nach 4 d ATc-Vorbehandlung durchgeführt. Die Spuren wurden mit einem  $\alpha$ -SAG1-Antikörper 1:1000 (Ziege- $\alpha$ -Maus Alexa Fluor® 546, 1:4000) angefärbt und am Zeiss Axio Imager Z1/Apotome detektiert. Aufgetragen ist der Median der mit dem *NeuronJ* ermittelten Länge von mindestens 500 Spuren der ATc-vorbehandelten Stämme. Die mit Hilfe des Plugins *Macro for Blind Analyses* verblindeten Daten wurden aus drei biologischen Replikaten erhoben und sind als *Box Plot* mit *Tukey-Style Whiskers* dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage einer *One-way ANOVA*-Analyse mit dem Kruskal-Wallis Test (\*\*  $P \leq 0,01$ ; ns nicht signifikant) **B** Aufnahmen der gemessenen Spuren von jeweils beispielhaft einem Parasiten der Stämme (parental, Fd ikd, Fd ikd kompl.) nach viertägiger ATc-Induktion. (Maßstabsbalken 5  $\mu$ m)

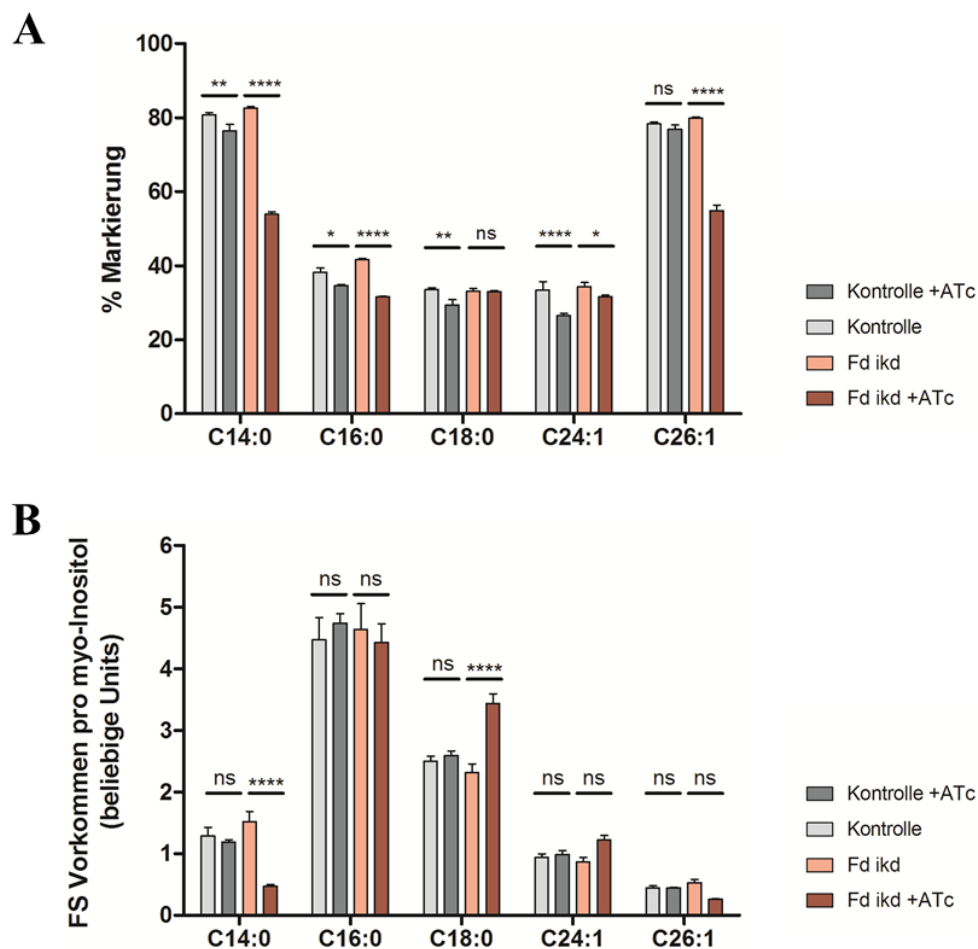
#### 4.3.6 Der Fd ikd-Stamm zeigt nach ATc-Induktion einen Mangel der im Apicolasten synthetisierten C14:0-Fettsäuren

Neben der bekannten Verknüpfung des Ferredoxin-Redoxsystems zur Isoprenoidsynthese (siehe 1.2.2) gilt die Verbindung des Ferredoxin-Redoxsystems zur Liponsäuresynthese zudem als wahrscheinlich (siehe 1.2.3). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch den Nachweis der PPI von Fd und LipA mittels RTHS gezeigt werden (siehe 4.1, Frohnecke *et al.* 2015). Wie in 1.2.3 beschrieben sollte eine Beeinträchtigung der Liponsäuresynthese durch Fd-Repression und somit einer möglichen ausbleibenden Lipoylierung der PDH-E2 Untereinheit zudem eine Auswirkung auf die im Apicoplasten stattfindende Fettsäuresynthese (FAS II) haben. Um die Produkte der Fettsäuresynthese des Fd ikd-Stammes zu untersuchen, wurden die Parasiten durch Wachstum in  $^{13}\text{C}$ -Glukose-haltigem Medium metabolisch markiert. Die markierte Glukose wird verstoffwechselt und so in verschiedenste Metabolite integriert. Nach Methanolyse wurden die Proben der stabilen Isotopen-markierten Primär- und Sekundärstoffwechselprodukte von einem Kooperationspartner mittels GC-MS analysiert (M. Blume, McConville-Labor in Melbourne, Australien). Als Kontrolle kam ein weiterer Fd ikd-Stamm zum Einsatz (5H, siehe Tab. 8), bei dem ATc-Behandlung im Plaqueassay sowie in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen keinerlei Veränderungen hervorrief (Daten nicht gezeigt). Da die erhaltenen Werte des extern zugegebenen Standards scyllo-Inositol sehr stark streuten und keine Aussage über das FS-Vorkommen lieferten, wurde das hier angegebene FS-Vorkommen auf myo-Inositol normalisiert, welches größtenteils aus Phosphatidylinositol- und Glycosylphosphatidylinositol-Anker der Parasiten selbst stammt. Die gemessenen FS können zum einen von der Wirtszelle aufgenommen worden sein (C14:0, C16:0) bzw. aus der FAS I (C16:0) oder FAS II hervorgegangen sein (C14:0, C16:0, Coppens *et al.* 2014). Zum anderen können die FS über den Elongationsweg synthetisiert worden sein (C18:0, C24:1, C16:1, Ramakrishnan *et al.* 2012).

Der Fd ikd-Stamm zeigte nach 90 h ATc-Induktion eine Reduktion sowohl der prozentualen Markierung (~35 %) als auch des Vorkommens (~70 %) der langkettigen, ungesättigten C14:0-Fettsäuren (FS) im Vergleich zum nicht induzierten Knockdown-Stamm (siehe Abb. 28A und B). Bei der prozentualen Markierung ist derjenige Prozentsatz der FS angegeben, bei dem mindestens eines der C-Atome durch  $^{13}\text{C}$  substituiert wurde. Es ergab sich zudem eine Verringerung der prozentualen Markierung (~31 %) der langkettigen, einfach gesättigten FS C26:1. Das Vorkommen der langkettigen, ungesättigten FS C18:0 war nach Induktion auffällig erhöht. Bei den weiteren untersuchten langkettigen, ungesättigten FS C16:0 sowie der langkettigen, einfach gesättigten FS C24:1 waren dagegen keine derartigen

Unterschiede der prozentualen Markierung gemeinsam mit dem Vorkommen der jeweiligen FS nach Induktion auszumachen. Der Kontrollstamm zeigte teils nach ATc-Induktion eine geringe Reduktion der prozentualen Markierung der FS, jedoch war bei keiner der gemessenen Fettsäuren ein verändertes Vorkommen der FS zu beobachten (siehe Abb. 28A und B).

Eine Fd Herabregulation des Fd *ikd*-Stammes bewirkt eine Reduktion der Markierung um ungefähr 30 % insbesondere der FS C14:0 und C26:1, aber auch für ein um 70 % vermindertes Vorkommen der C14:0-FS. Da die langkettige, gesättigte FS C14:0 unter anderem im Apicoplasten synthetisiert wird, scheint die Fd-Repression und als Konsequenz eine gestörte FAS II für die verringerte Markierung und auch das Vorkommen verantwortlich



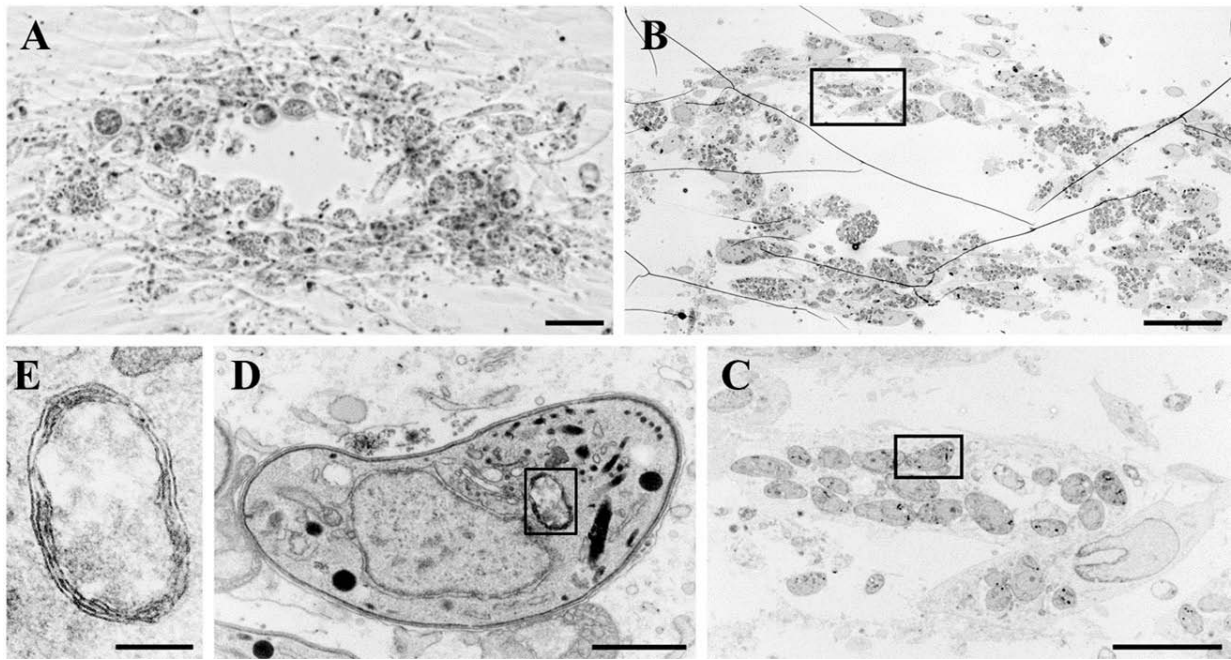
**Abb. 28: Reduktion der im Apicoplasten synthetisierten C14:0-Fettsäure des Fd *ikd*-Stammes nach ATc-Induktion**

Die Fettsäuren des Fd *ikd*- sowie des Kontrollstammes wurden durch Methanolyse extrahiert und mittels GC-MS von Martin Blume (*University of Melbourne*, Australien) untersucht. Aufgetragen sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung der prozentualen Markierung der Fettsäuren (A) und des Fettsäurevorkommens pro myo-Inositol (B). Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage einer *Two-way* ANOVA-Analyse mit anschließendem *Bonferroni-Test* (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ ; ns „nicht signifikant“)

zu sein. Ebenso ist eine verminderte prozentuale Markierung der aus dem Elongationsweg stammenden sehr langkettigen, einfach ungesättigten FS C26:1 eine mögliche direkte Folge der reduzierten FS C14:0 als Ausgangsstoff der Elongation.

#### **4.3.7 Keine morphologischen Veränderungen der Ferredoxin Knockdown Mutante in elektronenmikroskopischen Aufnahmen**

Die Fd Knockdown Mutante zeigte eine starke Wachstumsinhibition sowohl im Plaque- als auch im Replikationsassay (siehe 4.3.3 und 4.3.4). Zudem wies sie Einschränkungen in der Motilität als Folge einer beeinträchtigten Isoprenoidsynthese (siehe 4.3.5) und verminderte Mengen der in der FAS II im Apicoplast synthetisierten C14:0-FS auf (siehe 4.3.6). In der Folge war es von großem Interesse den Fd ikd-Stamm nach siebentägiger ATc-Induktion in einem Plaqueassay mittels korrelativer Transmissions-Elektronen-Mikroskopie zu untersuchen (siehe 3.3.5, Madela *et al.* 2014), um so mögliche ultrastrukturelle, morphologische Veränderungen durch die Fd Herabregulation detektieren zu können. Neben der Fd Knockdown Mutante wurden ebenfalls der komplementierte Fd ikd- als auch der parentale Stamm Elektronen-mikroskopisch untersucht. Dazu wurden zunächst mit Hilfe des Lichtmikroskops AxioObserver.Z1 Einzelplaques des in *μ-dish*-Zellkulturschalen durchgeführten Plaqueassays aufgenommen (siehe Abb. 29A) und die Koordinaten notiert. Die anschließende Elektronen-mikroskopische Untersuchung derselben Plaques lieferte die korrelativen Aufnahmen (siehe Abb. 29B-E). Wie zuvor in den durchgeführten Plaqueassays wiesen die Plaques des Fd ikd-Stammes im Vergleich zu den ebenfalls induzierten Kontrollstämmen (Fd ikd kompl., parentaler Stamm) eine deutlich reduzierte Größe auf (siehe Abb. 24B). In den Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen der Einzelplaques konnte jedoch keine ultrastrukturelle, morphologische Veränderung im Vergleich zum komplementierten Fd ikd- oder parentalen Stamm ausgemacht werden (siehe Abb. 29D). So waren zudem keinerlei Auffälligkeiten in der Anzahl der umgebenden Membranen oder generell in Größe, Form, Vorhandensein oder Struktur des Apicoplasten zu beobachten (siehe Abb. 29E). Auch konnten bei der Fd Knockdown Mutante keine Abweichungen in der Anzahl der Parasiten pro Vakuole im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen festgestellt werden. Die beobachtete Wachstumsinhibition des Fd ikd-Stammes scheint demnach eine biochemische anstatt eine zellulären oder strukturellen Ursache zu haben.



**Abb. 29: Keine morphologischen Veränderungen der Fd Knockdown-Mutante in Korrelativen Licht- und Transmissions-Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen eines Einzelplaques**

Licht- (A) und Transmissions-Elektronen-mikroskopische (B) Aufnahme eines Einzelplaques des Fd Knockdown-Stammes. C Vergrößerter Ausschnitt von Rechteck in B. TEM-Aufnahme von zwei einzelnen mit Parasiten-infizierten Wirtszellen. D Vergrößerter Ausschnitt von Rechteck in C. TEM-Aufnahme eines einzelnen Parasiten des Einzelplaques. E Vergrößerter Ausschnitt von Rechteck in D. TEM-Aufnahme eines Apicoplasten. (Maßstabsbalken: A und B 50 µm, C 10 µm, D 1 µm, E 200 nm. TEM Aufnahmen wurden angefertigt von Florian Müller, FG16, Robert Koch-Institut. Abb. verändert übernommen von F. Seeber, FG16, Robert Koch-Institut)

## 5. Diskussion

*T. gondii* gehört wie der Erreger der Malaria tropica, *P. falciparum*, zum Phylum der Apicomplexa und besitzt als Merkmal dieses Stammes ein Plastid-ähnliches Organell, den Apicoplasten, in dem aufgrund seiner endosymbiontischen Herkunft Stoffwechselwege lokalisiert sind, die potentielle Wirkstoff-Targets darstellen (siehe 1.2). So befindet sich im Apicoplasten das einzig bekannte Redoxsystem dieses Organells bestehend aus der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) und Ferredoxin (Fd; Vollmer *et al.* 2001). Das Ferredoxin-Redoxsystem nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus des Apicoplasten ein: So liefert Fd als Elektronendonator Elektronen an mindestens zwei essentielle Stoffwechselwege; an die Isoprenoid- und aller Voraussicht nach auch an die Liponsäuresynthese. Für eine Elektronenübertragung wird eine direkte PPI benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines bakteriellen *Reverse Two-Hybrid* Systems (RTHS) nachgewiesen werden sollte (siehe 5.1; Horswill *et al.* 2004). Zum anderen sollte als genereller Nachweis überprüft werden, ob Fd - als Bestandteil des voraussichtlich einzig vorhandenen, zentralen Redoxsystems des Apicoplasten - essentiell für das Überleben von *T. gondii* ist bzw. welche Auswirkungen eine Herabregulation der Fd-Expression auf *T. gondii* hat (siehe 5.2). Zur Überprüfung dieser These ist zum einen das DiCre Knockout-System zum Einsatz gekommen (Andenmatten *et al.* 2013) und zum anderen das Tet-induzierbare Knockdown-System (Meissner *et al.* 2002).

### 5.1 Protein-Protein-Interaktionsstudien von Fd-LipA und Fd-FNR mit Hilfe des bakteriellen *Reverse Two-Hybrid* Systems

Zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von Fd und möglichen Interaktionspartnern im Apicoplasten wurde im Rahmen dieser Arbeit das bakterielle RTHS verwendet (siehe 1.2.4). Dieses System wurde zum einen gewählt, da der Apicoplast eine reduzierende Umgebung darstellt (Gallagher und Prigge 2010) und diese Kondition im reduzierenden Zytosol der Bakterien für die zu untersuchenden Fd PPI im bakteriellen RTHS erfüllt ist. Zum anderen ist für [Fe-S]-Proteine bekannt, dass bei *in vitro* Versuchen strikte anaerobe Bedingungen zur Vermeidung der Bildung von Dimeren/Multimeren herrschen müssen (Rebeil und Nicholson 2001, Hanzelmann *et al.* 2004, Jakimowicz *et al.* 2005, Buis *et al.* 2006), welche am besten in einem zellulären System wie dem RTHS realisiert werden können. Durch die bedachte Auswahl des bakteriellen RTHS liefert eine mit diesem System nachgewiesene PPI – mit samt

geeigneter Kontrollen - eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass diese auch in *T. gondii in vivo* stattfindet. Eine hingegen ausbleibende PPI in diesem System kann mannigfaltige Ursachen haben (Horswill und Benkovic 2006) und muss in Bezug auf die Wahl des Systems und sonstige in der Literatur vorhandenen Daten für die zu analysierende Interaktion gesondert betrachtet und diskutiert werden. Das bakterielle RTHS basiert auf einem chimären Operator, der aus je einer Hälfte des Phagen P22 oder 434 und den jeweils daran N-terminal gebundenen zu untersuchenden Protein besteht (Di Lallo *et al.* 2001). Dieser Operator bildet bei Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Gegensatz zu *Yeast Two-Hybrid* Systemen einen funktionalen Repressor der Reportergene, so dass nach Induktion der Expression eine verringerte Reportergen-Aktivität im Vergleich zur nicht-induzierten Kultur gemessen wird (Horswill *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich verschiedene RTHS-Stämme mit *T. gondii* Proteinen hergestellt werden, welche voraussichtlich in das Ferredoxin-Redoxsystem involviert sind. Um die Teilhabe des Ferredoxin-Redoxsystems an der Liponsäuresynthese zu belegen, wurden in einem Stamm die Interaktionspartner Fd und LipA integriert. Zwei weitere Stämme enthielten als zentrale Komponente des Redoxsystems Fd und FNR bzw. Fd und eine mutierte Version von FNR (*FNRmut*, Thomsen-Zieger *et al.* 2004). Als Negativkontrolle wurde zudem ein Stamm generiert, der LipA und FNR enthielt, dessen Interaktion als unwahrscheinlich angesehen wird (Thomsen-Zieger *et al.* 2004, Frohnecke *et al.* 2015). Als Positivkontrolle diente ein Stamm, bei dem beide Untereinheiten der murinen Ribonukleotid-Reduktase mR1 und mR2 integriert waren, dessen Interaktion in der Vergangenheit bereits im RTHS durch Horswill *et al.* 2004 gezeigt werden konnte. Mit Hilfe der drei hinterlegten Reportergene (*lacZ*-, *HIS3* sowie KanR-Gen) sind verschiedene Interaktionsanalysen der RTHS-Stämme durchführbar. Neben dem Nachweis einer möglichen Interaktion der jeweiligen Interaktionspartner durch einen  $\beta$ -Gal-Assay (*lacZ*-Gen) eignet sich das RTHS zudem gezielt Dissoziatoren einer PPI zu finden. Dies wird durch die Kombination mit z.B. einer zyklischen Peptidbank möglich (Horswill *et al.* 2004). Eine Voraussetzung vor der Durchführung eines Screenings ist die Optimierung der Medienzusammensetzung, um sicher positive von falsch-positiven Kolonien unterscheiden zu können (Horswill und Benkovic 2006). Der RTHS-Stamm mit den Interaktionsproteinen Fd und LipA zeigte sowohl im  $\beta$ -Gal-Assay als auch bei der Optimierung der Screeningbedingungen eine robuste Interaktion, die im Vergleich zum Positivkontrollstamm wenig schwächer ausgeprägt war. Eine geringe Interaktion erwies sich für den Fd-*FNRmut* RTHS-Stamm, dessen Medienzusammensetzung wegen zu hoher und in der Folge toxischer Konzentrationen von Kan und 3-AT nicht für ein mögliches Screening optimiert werden konnte. Keine Interaktion hingegen



konnte für die Interaktionspartner Fd und FNR sowie, wie zu erwarten, für den Negativkontrollstamm nachgewiesen werden (siehe 4.1.2 und 4.1.3).

### 5.1.1 Ist die im bakteriellen RTHS ausbleibende Fd-FNR Interaktion den experimentellen Bedingungen geschuldet?

Die Elektronenübertragung vom Photosystem I zu Fd und FNR und somit die Interaktion des Redoxpaares ist lange bekannt und unbestritten (Shin *et al.* 1963, Shin und Arnon 1965, Shin und Pietro 1968, Foust *et al.* 1969). Es existieren Kristallstrukturen von Fd und FNR sowohl des *leaf*- als auch des *root*-Typs, in denen die relative Orientierung von Fd zu FNR beschrieben ist (Kurisu *et al.* 2001, Hanke *et al.* 2004). So sind auch die Kristallstrukturen des in *P. falciparum* vorhandenen nicht photosynthetisch-aktiven, *root*-Typ Fd sowie FNR bekannt (Kimata-Ariga *et al.* 2007a, Kimata-Ariga *et al.* 2007b, Milani *et al.* 2007) und die Interaktion beider eingehend analysiert (Balconi *et al.* 2009). Von *T. gondii* selbst ist die Kristallstruktur der Proteine dagegen bisher nicht bekannt, jedoch konnte mit Hilfe eines *Yeast Two-Hybrid* Systems die Interaktion sowohl von Fd und FNR (Pandini *et al.* 2002) als auch von Fd und einer mutierten Variante von FNR (FNR*mut*, Thomsen-Zieger *et al.* 2004) bereits nachgewiesen werden. Dabei ergab sich für FNR*mut* trotz Inaktivierung des Enzyms interessanterweise eine höhere Bindungsaffinität zu Fd. Die Inaktivierung beruht auf einer einzigen Punktmutation (S267R) in der FAD-bindenden Domäne des aktiven Zentrums von FNR (Thomsen-Zieger *et al.* 2004). Wegen der voraussichtlich zentralen Stellung des Fd-FNR Redoxpaares wird dieses in vielen Publikationen als potentiellles Wirkstoff-Target zur Behandlung parasitärer Infektionen mit Vertretern der Apicomplexa beschrieben (Vollmer *et al.* 2001, Pandini *et al.* 2002, Thomsen-Zieger *et al.* 2004, Seeber *et al.* 2005, Milani *et al.* 2007, Balconi *et al.* 2009, Boomgaren 2012, Gisselberg *et al.* 2013). Es ist überraschend, dass im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des bakteriellen RTHS mit den integrierten Fusionsproteinen von Fd und FNR keine Interaktion, also Repression, im  $\beta$ -Gal-Assay gezeigt werden konnte. Für die Interaktionspartner Fd und FNR*mut* konnte jedoch, wenn auch gering mit ungefähr 30 %iger Repression, eine Interaktion ermittelt werden (siehe 4.1.2).

Die gemessene, geringe Interaktion des Fd-FNR*mut*-Stammes ist im Gegensatz zur nicht nachgewiesenen Interaktion von Fd und FNR des entsprechenden RTHS-Stammes möglicherweise auf einen zusätzlichen HA-Tag im Fd-FNR*mut*-Stamm zurückzuführen. Denn abgesehen von den Punktmutationen in FNR (FNR*mut*: S267R, Q242R) unterscheiden sich die beiden RTHS-Stämme sowie die ursprünglichen Plasmide lediglich durch den HA-Tag voneinander. Dieser befindet sich im Fd-FNR*mut*-Konstrukt zwischen dem Phagen-

Fusionsprotein 434 und FNR $mut$  (siehe 7.4, pNF2-Fd-FNR $mut$ ). Der HA-Tag zwischen dem Repressorprotein und dem Interaktionsprotein kann so im Fd-FNR $mut$  RTHS-Stamm als Abstandshalter zu einer zusätzlichen Beweglichkeit und veränderten sterischen Stabilität von FNR $mut$  geführt haben, weshalb dort eine Interaktion mit Fd nachgewiesen werden konnte. Das Einfügen eines flexiblen Peptidabschnitts ist eine von Horswill und Benkovic 2006 empfohlene Möglichkeit zur Verstärkung einer Interaktion. Dabei wird in der Literatur häufig der Peptidlinker (GGGS) $_n$  mit  $n \leq 3$  verwendet, deren Aminosäuren sich insbesondere durch kurze und unverzweigte Seitenketten auszeichnen und so zur Flexibilität beitragen (Lu und Feng 2008). Der HA-Tag ist in der Literatur bisher nicht als flexibler Peptidlinker beschrieben, auf Grund der Länge von neun Aminosäuren ist es jedoch denkbar, dass er als ein solcher oder zumindest als Abstandshalter fungierte, so dass FNR $mut$  möglicherweise eine andere Proteinfaltung einnehmen konnte. Da sich in dem Fd-FNR RTHS-Stamm kein flexibler Peptidabschnitt, wie möglicherweise der HA-Tag, zwischen dem Fusionsprotein und FNR befindet, ist die nicht nachgewiesene Interaktion dieser Proteine gegebenenfalls auf eine fehlende Beweglichkeit und in der Folge auf einer modifizierten Proteinfaltung von FNR zurückzuführen. Weiterhin ist denkbar, dass durch eine eingeschränkte Beweglichkeit von FNR, gebunden an das Fusionsprotein 434, die Fd-Bindungsstelle, verursacht durch sterische Hinderung von 434, für Fd nicht zugänglich ist (Horswill und Benkovic 2006). Entsprechend ist es möglich, dass das Einfügen eines Peptidlinkers, wie dem HA-Tag, die Interaktions-Einschränkung von Fd und FNR aufhebt und somit mit dem  $\beta$ -Gal-Assay nachweisbar ist.

Horswill und Benkovic 2006 empfehlen als weitere Alternative bei ausbleibender Interaktion der gewünschten Interaktionspartner einen Tausch der Repressorproteine, um so möglicherweise den Genort für die Fusionsproteine zugänglich zu machen. Mit dem ähnlichen RTHS-Stamm Fd-FNR $mut$  konnte in dieser Anordnung der DNA-bindenden Proteine jedoch eine Interaktion bereits nachgewiesen werden. Gegebenenfalls kann ein Tausch der Proteine bei beiden Stämmen zu einer Verstärkung der Interaktion führen.

Bakterielle Systeme zur Interaktionsanalyse, wie das RTHS, besitzen neben vielen Vorteilen, wie insbesondere der Kombination mit einer zyklischen Peptidbank und einer hohen Transformationseffizienz von *E. coli* (Horswill *et al.* 2004, Horswill und Benkovic 2006), den Nachteil, dass post-translationale Modifikationen im Gegensatz zu *Two-Hybrid* Systemen in Hefen nicht stattfinden (Stasi *et al.* 2015). Eine fehlende post-translationale Modifikation kann in einem bakteriellen *Two-Hybrid* System möglicherweise zu einer ausbleibenden Interaktion der zu untersuchenden Proteine führen. Bei der Betrachtung von post-translationalen Modifikationen kommt vornehmlich FNR und nicht Fd in Betracht, da

wie eingangs erwähnt (siehe 5.1), die Interaktion von Fd und LipA bereits nachgewiesen werden konnte und bei Fd im Umkehrschluss mutmaßlich eine fehlende post-translationale Modifikation zu keiner Interaktionseinschränkung führte. In *T. gondii* sind verschiedenste post-translationale Modifikationen bekannt, wie Phosphorylierungen (Treeck *et al.* 2011), Glykosylierungen (Luo *et al.* 2011), Palmitoylierungen (Frenal *et al.* 2014) und Acetylierungen (Xue *et al.* 2013). Intensiv untersucht wurden sie in *T. gondii* bei den Tubulinen des Cytoskeletts (Plessmann *et al.* 2004, Xiao *et al.* 2010) als auch bei den Histonen zur Genregulation (Vanagas *et al.* 2012, Nardelli *et al.* 2013). Es existieren derzeit jedoch kaum Daten über post-translationale Modifikationen von FNR im Allgemeinen und TgFNR im Speziellen; es sind lediglich Rückschlüsse auf post-translationale Modifikationen von TgFNR durch Vergleich der Homologien der unterschiedlichen FNR-Sequenzen untereinander möglich. FNR verschiedener Organismen besitzen insbesondere in den katalytisch aktiven Bereichen hohe Sequenzhomologien (Vollmer *et al.* 2001, Kimata-Ariga *et al.* 2007b, Milani *et al.* 2007), wobei die FNR-Sequenzen von Apicomplexa im Vergleich zu denen von Pflanzen teilweise im FAD- und NADP-Bindungsbereich variieren (Milani *et al.* 2007). Durch drei, teils lange Aminosäuren-Insertionen in den FNR-Sequenzen von Apicomplexa bestehen zudem große Unterschiede zu FNR-Sequenzen anderer Organismen (Bednarek *et al.* 2003). Insgesamt besitzt die FNR-Sequenz von *T. gondii* mehr Übereinstimmungen der FNR-Sequenzen zu nicht photosynthetisch-aktiven FNRs (*root-type*) im Vergleich zu photosynthetisch-aktiven (*leaf-type*) FNRs (Vollmer *et al.* 2001). Bislang sind keine Daten zu post-translationalen Modifikationen von *root-type* FNR vorhanden. Über *leaf-type* FNR sind dagegen verschiedene Aspekte zur post-translationalen Modifikationen beschrieben. So wird beispielweise diskutiert, ob FNR von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, Acker-Schmalwand) phosphoryliert vorliegt. Dies stellt insofern einen interessanten Aspekt dar, da die Phosphorylierung von FNR in *A. thaliana* die Regulation über den zu beschreitenden -zyklischen oder linearen - Elektronenfluss einnehmen soll (Hodges *et al.* 1990). Der lineare oder zyklische Elektronentransport findet während der Lichtreaktion bei photosynthetisch-aktiven Pflanzen in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten statt: Am Ende des Photosystems I fließen die Elektronen des Ferredoxin-Redoxsystems entweder weiter in das Photosystem II (linear) oder wieder in das Photosystem I (zyklisch; Goldschmidt-Clermont und Bassi 2015). Jedoch ist die Datenlage dazu konträr und nach aktuellem Stand nicht nachgewiesen, ob FNR von *A. thaliana* tatsächlich phosphoryliert vorliegt (Sugiyama *et al.* 2008, Moolna und Bowsher 2010, Yang *et al.* 2013). Ob trotz Abwesenheit der Photosynthesemaschinerie im nicht-photosynthetischen Parasiten *T. gondii*

Phosphorylierungen von FNR zur Regulation des Redoxsystems stattfinden, bleibt offen. Somit ist es auch unklar, ob diese fehlende post-translationale Modifikation im RTHS zur ausbleibenden Interaktion von *TgFd* und *TgFNR* beigetragen hat.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass beide Isoformen des *leaf-type* FNR (FNR1 und FNR2) von *A. thaliana* N<sup>α</sup>-Acetylierungen aufweisen (Lehtimäki *et al.* 2014). N<sup>α</sup>-Acetylierungen stellen den Übertritt von FNR in den Chloroplasten sicher, bewirken aber auch eine stärkere Bindung zu den beiden in *A. thaliana* vorkommenden Fd-Isoformen (Hanke und Hase 2008, Lehtimäki *et al.* 2014). Dabei ist zu bedenken, dass sich zum einen nicht photosynthetisch-aktive ptFd von *T. gondii* und dem ptFd aus photosynthetisch-aktiven Organismen unterscheiden und zum anderen zahlreiche Isoformen von Fd existieren (Hanke und Mulo 2013), weshalb unterschiedliche PPI bei verschiedenen Organismen und Isoformen der Proteine vorhanden sind (Aliverti *et al.* 2008). Xue *et al.* 2013 untersuchte das Acetylom von intra- sowie extrazellulären *T. gondii* Tachyzoiten. Unter den über 700 detektierten acetylierten Proteinen befanden sich dabei weder *TgFd* noch *TgFNR*. Eine fehlende Acetylierung wird dementsprechend vermutlich nicht der Grund für eine ausbleibende PPI im RTHS gewesen sein.

Eine weitere Art der post-translationalen Modifikation wurde bei FNR von *Chlamydomonas reinhardtii*, einer Grünalge, gezeigt. Dort wurden drei verschiedene Lysin- Reste identifiziert, die methyliert vorliegen (Decottignies *et al.* 1995). Einem der drei methylierten Lysin-Reste von *Chlamydomonas reinhardtii* (K89) entsprechender Lysin-Rest in *Spinacia* (K88) soll an der Interaktion mit Fd beteiligt sein, wobei die Autoren betonen, dass für die Interaktion eine positive Ladung an dieser Stelle benötigt wird (Aliverti *et al.* 1994). Die nach Methylierung weiterhin vorhandene positive Ladung des Lysins ist demnach entscheidend an der Interaktion mit Fd beteiligt. Sowohl der methylierte Lysin-Rest in *Spinacia* (K88) als auch einer der drei methylierten Lysin-Reste in *Chlamydomonas reinhardtii* (K89) stellen einen konservierten Lysin-Rest der jeweiligen FNR-Sequenzen dar (Decottignies *et al.* 1995), welches zudem in der *root-type* FNR-Sequenz von *Zea mays* zu finden ist (siehe \* in Abb. 30). Dieses Lysin liegt innerhalb einer Region (siehe Abb. 30, Aminosäuren 78-89 von *Zea mays root-type*), welche in FNR von Pflanzen und Cyanobakterien eine oberflächliche Schleife ausbilden, die an der Interaktion mit Fd beteiligt sein soll (Maeda *et al.* 2005). Dieser Sequenzausschnitt ist in Bednarek *et al.* 2003 mit der FNR-Sequenz von *T. gondii* verglichen worden und in Abb. 30 modifiziert dargestellt. Es wird deutlich, dass die *T. gondii* FNR-Sequenz den Lysin-Rest an dieser Stelle nicht besitzt, sondern stattdessen einen ungeladenen Alanin-Rest (A). Fünf Aminosäuren dahinter (*downstream*) befindet sich in der *T. gondii* FNR-Sequenz eine der

eingangs und in 1.2.1 erwähnten Insertionen von 28 Aminosäuren, die ebenfalls eine, jedoch noch größere oberflächliche Schleife bildet, und voraussichtlich an der Bindung mit Fd beteiligt ist (Pandini *et al.* 2006). Darin ist ein Lysin-Rest gelegen (siehe # in Abb. 30), der möglicherweise *in vivo* in *T. gondii* methyliert vorliegt und so die Interaktion verstärkt. Eine fehlende Methylierung wegen ausbleibender post-translationaler Modifikation im RTHS könnte demnach zur Abschwächung oder zum Ausbleiben der PPI von Fd und FNR führen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Methylierung zudem im Fd-FNR*mut* RTHS-Stamm gefehlt haben muss. Dort konnte hingegen eine Interaktion der Proteine gezeigt werden. Im Vergleich zu FNR besitzt FNR*mut* trotz Inaktivierung des Enzyms eine erhöhte Bindungsaffinität zu Fd, weshalb - trotz allem - eine Interaktion gemessen werden konnte (Thomsen-Zieger *et al.* 2004). Womöglich wäre die Interaktion von Fd und FNR*mut* im RTHS-Stamm stärker ausgefallen, wenn der Lysin-Rest methyliert gewesen wäre.



**Abb. 30: FNR Proteinsequenz-Vergleich von *root-type Zea mays* und *T. gondii***

An der Stelle des mit \*-markierten Lysins (K) der *root-type* FNR-Sequenz von *Zea mays* befindet sich in der *T. gondii* FNR-Sequenz ein ungeladenes Alanin (A). In der *T. gondii* FNR-Sequenz befindet sich ein mit #-markiertes Lysin (K). Schwarz hinterlegte Bereiche markieren eine stark konservierte Region der Sequenz. Abb. modifiziert nach Bednarek *et al.* 2003.

## Fazit

FNR verschiedener Organismen variieren in ihrer Sequenz unterschiedlich stark, so dass die hier für *leaf-type* FNR beschriebenen post-translationalen Modifikationen nicht ohne weiteres auf *root-type* FNR, wie in *T. gondii*, übertragen werden können. Inwiefern die fehlende Möglichkeit zur post-translationalen Modifikation im bakteriellen RTHS die Interaktion von Fd und FNR beeinflusst hat, können aufgrund der mangelnden Datenlage zu post-translationalen Modifikationen von *root-type* FNR bzw. von TgFNR lediglich Spekulationen angestellt werden. Die diskutierte, im bakteriellen RTHS ausbleibende Methylierung der Lysin-Reste der *T. gondii* FNR-Sequenz oder eine möglicherweise fehlende Phosphorylierung von TgFNR könnte bei der PPI von Fd und FNR sowie Fd und FNR*mut* eine Rolle gespielt haben. Um die Interaktion von Fd und FNR zu untersuchen, bietet es sich an, die PPI von TgFd und TgFNR*mut* eingehend zu analysieren, da sich FNR und FNR*mut* nur in zwei Punktmutationen unterscheiden. Da eine Kombination mit einer zyklischen Peptidbank (SICLOPPS) und somit die Möglichkeit besteht, einen geeigneten Dissoziator der

PPI zu finden, sind weitere Anstrengungen sinnvoll, die jeweiligen RTHS Stämme so zu modulieren, dass eine robuste Interaktion von *TgFd* und *TgFNR* bzw. *TgFNRmut* detektiert wird.

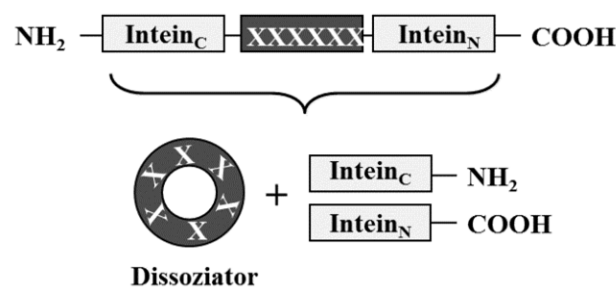
### 5.1.2 Direkte PPI von Fd und LipA im RTHS

Eine deutliche PPI zeigte der RTHS-Stamm, der die *T. gondii* Proteine Fd und LipA integriert hat, im Gegensatz zu den Interaktionspaar Fd und FNR/FNRmut. Diese konnte im  $\beta$ -Gal-Assay durch eine Repression von ungefähr 50 % festgestellt werden (siehe 4.1.2). Bei der Optimierung der Screeningbedingungen erwies sich diese zudem als robust und lieferte konkrete Konzentrationen der Selektionsmarker (Kan, 3-AT), die es erlauben zwischen induzierten und nicht-induzierten Bedingungen stringent unterscheiden zu können, um so das Level an Hintergrund-Kolonien gering zu halten (siehe 4.1.3). Eine optimierte Medienzusammensetzung stellt die Voraussetzung dar, um für diesen RTHS-Stamm eine Kombination mit einer zyklischen Peptidbank vorzunehmen mit dem Ziel einen Dissoziator der PPI von Fd und LipA zu erhalten. Im Zusammenhang mit dem RTHS ist bereits die *Split Intein-Mediated Circular Ligation Of Peptides and Proteins* (SICLOPPS)-Methode als zyklische Peptidbank erprobt (Horswill *et al.* 2004). So wurden durch die Kombination beider Systeme für die Ribonukleotid Reduktase zyklische Peptid-Inhibitoren als Dissoziatoren dieses Heterodimers identifiziert. Die murine Ribonukleotid Reduktase diente daher in dieser Arbeit als Kontrolle des Systems. Die SICLOPPS-Methode basiert auf der sogenannten Intein-Chemie, bei der eine aus sechs beliebigen Aminosäuren bestehenden Peptid-Sequenz von zwei Teilen eines Split-Inteins flankiert wird. Beim Protein-Spleißen kommt es dann zu einem Ringschluss der von den Split-Inteinen umgebenden Peptid-Sequenz und schließlich zur Bildung von zyklischen Peptiden (siehe Abb. 31, Scott *et al.* 1999). Beinhaltet die Peptid-Bank ein zyklisches Peptid, welches die PPI aufheben kann, führt dies zum Ablesen der Reporterkassette und somit zu einem Wachstum der Bakterien bei entsprechenden Selektionsbedingungen (siehe Abb. 7B).

In der von mir betreuten Masterarbeit von A. Preiß mit dem Thema „Identifizierung zyklischer Peptide als Dissoziatoren der *Toxoplasma gondii* Ferredoxin-Liponsäure Synthase Interaktion“ konnte bereits erfolgreich ein Kontrollprotein generiert werden, bei welchem die Zyklisierung des gewählten Proteins *in vitro* durch Western Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass das entsprechende Protein nach Einbringen in *T. gondii* zyklisiert im Apicoplasten vorliegt (Preiß 2014). Diese Erkenntnisse schaffen für die

Entwicklung eines Dissoziators mit Hilfe einer zyklischen Peptidbank der Apicoplasten-lokalisierten Fd-LipA Interaktion eine wichtige Grundlage. LipA ist, wie in 1.2.3 erläutert, an der LA-Synthese (Lipoylierung) durch den Schwefelatom-Einbau in die Octanoyl-Seitenkette der PDH-E2 beteiligt (siehe Abb. 6). Die lipoylierte PDH-E2 Untereinheit ist für die enzymatische Aktivität der PDH und somit in der Folge für den Ablauf der FAS II im Apicoplasten unerlässlich (Crawford *et al.* 2006, Mazumdar *et al.* 2006). Die Entdeckung eines Dissoziators der Fd-LipA Interaktion und damit der Elektronenübertragung dieser beiden würde daher einen potentiellen Wirkstoff in der Behandlung der Toxoplasmose darstellen.

Die Interaktion der beiden *T. gondii* Proteine Fd und LipA wurde zuvor bereits in unserer Arbeitsgruppe in einem *Yeast Two-Hybrid* System bestimmt und gemeinsam mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten des bakteriellen RTHS publiziert (Frohnecke *et al.* 2015). Die Daten liefern den ersten experimentellen Nachweis, dass ein ptFd und ein eukaryotisches LipA direkt miteinander interagieren. Demnach ist ein direkter Elektronentransfer von TgFd auf TgLipA in *T. gondii* sehr wahrscheinlich. Dies wird dadurch gestützt, dass in Pflanzen und Bakterien bei der Biotinsynthese eine ähnliche Reaktion stattfindet: die Insertion von einem Schwefelatom in Dethiobiotin durch das ebenfalls zur Radikal-SAM Superfamilie gehörende Enzym BioB (Lanz und Booker 2012). Auch dort findet der bei der Reaktion benötigte Elektronentransport über [Fe-S]-Cluster statt, hier unter Mitwirkung des Flavin-Mononukleotid-enthaltenden Flavodoxins und der Flavodoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (Ceccarelli *et al.* 2004, Fugate und Jarrett 2012).



**Abb. 31: Schematische Darstellung der SICLOPPS Funktionsweise**

Durch die spezifische Anordnung eines DnaE-Inteins von *Synechocystis* wird ein von Intein<sub>C</sub>- und Intein<sub>N</sub>-flankiertes, sechs Aminosäuren-langes Peptidfragment (X steht für eine beliebige Aminosäure) der Intein-Chemie unterzogen, woraufhin es zur Zyklisierung der Peptidsequenz kommt (Scott *et al.* 1999). Die so erhaltene genetisch kodierte, zyklische Peptidbank ist in ihrer Komplexität lediglich durch die Transformationseffizienz von *E. coli* limitiert, die bei 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> liegt (Tavassoli und Benkovic 2007). (Abb. modifiziert nach Horswill und Benkovic 2005)

## Fazit

Da der Elektronentransfer von Fd auf LipA, wie oben ausgeführt, als sehr wahrscheinlich angesehen wird, ist umso bemerkenswerter, dass die Interaktion von Fd und FNR mit Hilfe des entsprechenden RTHS-Stammes nicht nachgewiesen werden konnte. Denn bevor *in vivo* Elektronen von *TgFd* auf *TgLipA* transferiert werden, findet eine FNR-vermittelte Elektronenübertragung von NADPH auf *TgFd* statt. Diese initiale Elektronenübertragung ist möglicherweise durch eine fehlerhafte Proteinfaltung auf Grund eines fehlenden Peptidlinkers oder in einer ausbleibenden post-translationalen Modifikation bei Verwendung des bakteriellen RTHS begründet (siehe 5.1.1). Die postulierte Interaktion von Fd und LipA jedoch kann aufgrund der erhobenen Daten sowohl im bakteriellen RTHS als auch mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems als bestätigt angesehen werden und liefert so ein weiteres Elektronenakzeptorprotein für das Ferredoxin-Redoxsystem.

## 5.2 Konditionale Ferredoxin Knockout- und Knockdown-Studien in *T. gondii*

Das Ferredoxin-Redoxsystem spielt im Apicoplasten von *T. gondii* eine zentrale Rolle in mehreren, essentiellen Synthesewegen verschiedener Metabolite, wie bei der Isoprenoidsynthese (Nair *et al.* 2011) als auch voraussichtlich bei der Liponsäuresynthese und somit bei der essentiellen FAS II (Mazumdar *et al.* 2006). So wurde in *T. gondii* ein Knockdown sowohl von DOXPRI als auch von LytB hergestellt, welches beide Enzyme der Isoprenoidsynthese darstellen, die sich jeweils als essentiell für das Überleben der Parasiten herausstellten (siehe Abb. 3, Nair *et al.* 2011). Bei LytB handelt es sich um ein Enzym, welches sich in *P. falciparum* als Elektronenakzeptor von Fd herausgestellt hat (Rohrich *et al.* 2005), weshalb erwartet wird, dass sich Fd auch in *T. gondii* als essentiell erweist.

Bei der Fettsäuresynthese (hier FAS II) findet ein sukzessiver Anbau von zwei Kohlenstoffatomen (Malonyl-CoA) an ein durch ACP gebundenes Acetyl-CoA statt, wodurch die Carbonsäure stetig wächst (Ramakrishnan *et al.* 2013). ACP erwies sich als essentiell für *T. gondii*, da ein ACP Knockdown zum Absterben der Parasiten führte (siehe Abb. 3; Mazumdar *et al.* 2006). Dieser ACP Knockdown zeigte zudem in einer GC-MS Analyse nach metabolischer Markierung mit  $^{13}\text{C}$ -Glukose-Markierung eine drastische Reduktion der aus der FAS II stammenden FS (Ramakrishnan *et al.* 2012). Die FAS II ist mit der Liponsäuresynthese eng verbunden: Eine der vier Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase (PDH, Untereinheit PDH-E2) trägt eine Lipoylierung, welche für die enzymatische Aktivität des Komplexes unerlässlich ist (Crawford *et al.* 2006). Die bei der Liponsäuresynthese



notwendige Elektronenübertragung von Fd auf LipA findet durch direkte PPI beider Enzyme statt, was im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines RTHS nachgewiesen wurde (siehe 5.1.2, Frohnecke *et al.* 2015). Demnach ergibt sich auch im Hinblick auf die Liponsäure- und Fettsäuresynthese, dass sich Fd als essentiell für das Überleben der Parasiten herausstellen sollte. Eine Fd Herabregulation (Knockdown) oder eine Exzision des Fd-Gens (Knockout) – beide Strategien wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt – sollten aufgrund mehrerer betroffener Stoffwechselwege zu einem komplexen biochemischen Phänotyp bis zum Absterben der Parasiten führen.

### Die Limitationen des DiCre Systems

Das DiCre-System, welches von Andenmatten *et al.* 2013 für *T. gondii* etabliert wurde, ermöglicht eine konditionale Exzision eines loxP-flankierten Gens durch eine dimerisierbare Cre-Rekombinase und damit die Herstellung einer Knockout-Mutante (siehe 1.3); es wurde seit der Publikation in 2013 mehrfach erfolgreich angewandt (Bargieri *et al.* 2013, Frenal *et al.* 2013, Egarter *et al.* 2014, Rugarabamu *et al.* 2015). Das DiCre-System erlaubt im Gegensatz zum Tet-induzierbaren System die Expression des entsprechenden Gens durch den endogenen Promoter, so dass der richtige Zeitpunkt und die Stärke der Expression des Gens gegeben sind (Ferguson und Dubremetz 2014). Eine erfolgreiche Exzision des gewünschten Gens wird durch ein erst nach der Exzision exprimiertes, fluoreszierendes YFP ersichtlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein stabil transfizierter Fd Knockout-Stamm mit endogener Promoterregion generiert werden (siehe 4.2.1). Dieser zeigte jedoch weder nach Induktion der Exzision durch Rapamycin-Behandlung noch bei transienter Transfektion mit einer zusätzlichen Cre-Rekombinase eine Fd Exzision, welche durch eine grüne Fluoreszenz der Parasiten in der Fluoreszenz-Mikroskopie ersichtlich wäre (siehe 4.2.2 und 4.2.5). Die Funktionalität des Fd Knockout-Konstruktes zur Möglichkeit der Exzision von Fd wurde *in vitro* mit Hilfe eines Cre-Rekombinase exprimierenden Bakterienstamm nachgewiesen (siehe 4.2.4). Eine transiente Transfektion eines Fd Knockout-Konstruktes mit Tub8-Promoter im Gegensatz zum endogenen Promoter in den parental DiCre-Stamm zeigte durch grün fluoreszierende Parasiten (= Fd Exzision) in der Fluoreszenz-Mikroskopie nach Rapamycin-Behandlung ebenfalls die Funktionalität des Knockout-Konstrukts (siehe 4.2.3). In anschließenden von S. Zander durchgeführten Versuchen (FG16, Robert Koch-Institut) konnte erstmals nach transienter Transfektion mit einer zusätzlichen Cre-Rekombinase in den stabil transfizierten Fd Knockout-Stamm mit endogener Promoterregion eine Fd Exzision durch die Detektion eines Signals mittels  $\alpha$ -GFP-Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da sich YFP von GFP lediglich durch eine Mutation unterscheidet (Wachter *et al.*

1998), ist eine Detektion von YFP mit Hilfe des  $\alpha$ -GFP-Antikörpers möglich. Die YFP-Expression war erneut nicht durch eine grüne Fluoreszenz der Parasiten ersichtlich, was auf einen schwachen endogenen Fd Promoter schließen lässt. Denn um ein GFP- bzw. YFP-Signal, das stärker als die Autofluoreszenz einer typischen Säugerzelle ist, mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie detektieren zu können, ist 1  $\mu$ M korrekt gefaltetes GFP nötig (Cheng *et al.* 1996, Tsien 1998). Diese Menge YFP wurde vermutlich nicht durch Verwendung des endogenen Fd Promoters erreicht. Die Untersuchung des mit der Cre-Rekombinase transient transfizierten stabilen Fd Knockout-Stammes erfolgte 48 h nach Transfektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die mit dem  $\alpha$ -GFP-Antikörper nachweisbaren Parasiten in verschiedenen Phasen der Replikation in den Vakuolen (4-32 Parasiten pro Vakuole). Es waren jedoch keineswegs nur einzelne Parasiten detektierbar, was ein Hinweis auf ein unmittelbares Absterben der Parasiten nach Fd Exzision gewesen wäre. Der Nachweis des Myc-Signals wurde zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt; dies hätte das mögliche Vorhandensein von Fd auf Proteinebene bestätigen können. Bei der Fd Knockdown Mutante konnte nach ATc-Behandlung in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen erst nach 48 h ein Ausbleiben der Färbung des Myc-markierten Fd festgestellt werden (siehe unten und 4.3.2). Gemeinsam deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Fd vermutlich ungefähr 48 h stabil ist.

Bleibt ein direkter Effekt der Fd Exzision wegen eines verzögerten Eintretens und einer nicht 100 %igen Effizienz der Rapamycin-Behandlung aus, stellt sich eine Analyse der Auswirkungen eines Fd Knockouts als schwierig dar. Die Effizienz einer Rapamycin-Behandlung liegt, wie in der Literatur beschrieben, bei 20-90 % (Ferguson und Dubremetz 2014) bzw. 20-96 % (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014) und in dieser Arbeit bei 20 % (Kontrollstamm mit loxP-flankiertem *KillerRed*, siehe 4.2.2). Der Eintritt der Exzision des gewünschten Gens setzte bei Andenmatten *et al.* 2013 bereits nach einer Stunde, in dieser Arbeit für den Kontrollstamm hingegen erst nach 36 h Rapamycin-Induktion ein (siehe 4.2.2) und ist in weiteren Arbeiten mit unter vier Stunden beschrieben (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014). Gemeinsam mit einem vermutlich ungefähr 48 h stabilen Fd, welches mit Hilfe des Fd Knockdowns bestimmt wurde (siehe 4.3.2), sind die Auswirkungen des Fd Knockouts voraussichtlich erst im zweiten oder dritten lytischen Zyklus zu erwarten. Da die Effizienz einer Rapamycin-Behandlung in dieser Arbeit nur 20 % betrug, ist davon auszugehen, dass die von einer Fd Exzision nicht betroffenen Parasiten einer Kultur die vermutlich schwer beeinträchtigten Fd Knockout Parasiten überwachsen. Letztendlich stellt der Anteil der Fd Knockout Parasiten dann nur noch einen Bruchteil der in der Kultur vorhandenen Parasiten dar, die nach der

ersten oder zweiten Passage aufgrund der dann hohen Zahl nicht betroffener Parasiten verloren gehen. Untersuchungen, wie die Fettsäuren-Extraktion, in denen durch Antikörperfärbungen ( $\alpha$ -GFP,  $\alpha$ -Myc) nicht klar ersichtlich ist, ob eine Fd Exzision stattgefunden hat oder nicht, sind daher nicht möglich. Um diejenigen Parasiten, in denen das gewünschte Gen herausgeschnitten wurde, zu isolieren, kann aufgrund der grünen Fluoreszenz der Parasiten oder im Falle des Fd Knockouts mit Hilfe einer  $\alpha$ -GFP-Antikörperfärbung eine FACS-Analyse durchgeführt werden (Andenmatten *et al.* 2013, Jimenez-Ruiz *et al.* 2014). Können wegen des verwendeten DiCre-Systems keine weiteren biochemischen Untersuchungen vorgenommen werden, eignet sich die CLEM-Methode (Madelä *et al.* 2014), um einzelne Parasiten korrelativ sowohl Immunfluoreszenzmikroskopisch zum Nachweis der Fd Exzision als auch im Anschluss Elektronenmikroskopisch auf ultrastrukturelle Veränderungen zu untersuchen.

### **Die Fd Defizienz zeigt weitreichende Auswirkungen auf das Parasitenwachstum**

Das Tet-induzierbare System (siehe 1.3) zur Herstellung einer konditionalen Knockdown Mutante stellte zu Beginn dieser Arbeit (2011) eine Art „Goldstandard“ bei der Analyse von essentiellen Genen in *T. gondii* dar. Dabei wird dem Gen von Interesse ein Tet-induzierbarer Promoter vorgeschaltet, bei welchem durch die Zugabe von Tet oder –derivaten die Expression des entsprechenden Gens reprimiert wird (Meissner *et al.* 2002). Eine Vielzahl von Genen wurde mit Hilfe dieses Systems untersucht (siehe in Limenitakis und Soldati-Favre 2011). In der Literatur wird vielfach bei Verwendung dieses Systems unkorrekterweise von Knockout- anstatt Knockdown-Mutanten berichtet (u.a. Starnes *et al.* 2009, Lorestani *et al.* 2010, Mueller *et al.* 2013), obwohl eine Hintergrund-Expression aufgrund eines unzureichend reprimierten Promoters nicht ausgeschlossen werden kann (Andenmatten *et al.* 2013, Jimenez-Ruiz *et al.* 2014). Das System stellt insofern einen großen Vorteil dar, da eine Genexpression reversibel regulierbar ist und zudem klonale Knockdown-Kulturen des entsprechenden *T. gondii*-Stammes erhalten werden können, bei welchen die Auswirkungen einer Herabregulation des Gens analysiert werden können (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014).

Die bei der erfolgreichen Herstellung der Fd Knockdown Mutante eingebrachte Myc-Markierung von Fd konnte nach zwei Tagen unter ATc-Induktion mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht mehr detektiert werden (siehe 4.3.2). Der generierte Fd ikd-Stamm zeigte nach Fd Herabregulation durch ATc-Induktion eine starke Wachstumsinhibition, die mit Hilfe von Plaqueassays bestimmt wurde (siehe 4.3.3). Zudem konnte bei einem Replikationsassay im zweiten und vor allem im dritten lytischen Zyklus eine stark verminderte Replikation nach ATc-Induktion festgestellt werden (siehe 4.3.4). Fd spielt

voraussichtlich eine zentrale Rolle im Stoffwechsel des Apicoplasten und dient dabei vermutlich als Elektronendonator an die Isoprenoid- und die Fettsäuresynthese (FAS II, siehe 1.2). Eine Beeinträchtigung der Isoprenoissynthese kann indirekt die Motilität der Parasiten durch eine Abnahme des Dolichol-Gehalts und einer dadurch verringerten N-Glykosylierung von GAP50 einschränken, wobei GAP50 eine Komponente des Multiprotein-Komplexes der Motilität von *T. gondii* darstellt (siehe 4.3.5). Dabei konnte für die Fd Knockdown Mutante im Vergleich zum komplementierten als auch zum parental Stamm eine um 20 % signifikant reduzierte Motilität bestimmt werden. Um die Produkte der Fettsäuresynthese des Fd ikd-Stammes zu analysieren, wurden die Parasiten durch Wachstum in  $^{13}\text{C}$ -Glukose-haltigem Medium metabolisch markiert. Nach Methanolyse wurden die Proben der stabilen Isotopen-markierten Fettsäuren mittels GC-MS analysiert und insbesondere von der im Apicoplasten synthetisierten C14:0-FS eine 30%ige, signifikante Reduktion ermittelt (siehe 4.3.6). Dieser Einfluss in biochemischen Vorgängen im Fd ikd-Stamm spiegelte sich jedoch nicht in ultrastrukturellen, morphologischen Veränderungen in Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen wieder (siehe 4.3.7).

Die erst nach zwei Tagen ATc-Induktion nicht mehr nachweisbare Fd Myc-Markierung des Fd ikd-Stammes in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, erklärt das verzögerte Eintreten einer verminderten Verdopplungszahl der Parasiten ab dem zweiten lytischen Zyklus. Wobei an dieser Stelle darauf hingewiesen werden muss, dass die Sensitivität des verwendeten Myc-Antikörpers unbekannt ist, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass zu einem späteren Zeitpunkt Fd noch in geringen Mengen vorhanden war, jedoch mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht detektiert werden konnte. Um eine möglicherweise verbleibende Restmenge an exprimierten Fd detektieren zu können, ist die Durchführung einer Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nötig. Bei der RT-PCR wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase aus RNA cDNA generiert, die wiederum in einer Real-Time PCR die Quantifizierung der Genexpression erlaubt (Shaffer *et al.* 1990). Diese wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit für die Bestimmung der restlichen Fd Expressionsmenge nicht etabliert. Um den Tet-induzierbaren Promoter der Fd Knockdown Mutante in Bezug auf eine unzureichende Fd Repression abschließend beurteilen zu können, bietet sich die Durchführung einer RT-PCR an. Die festgestellte reduzierte Motilität sowie ein verändertes, geringeres FS-vorkommen (C14:0) kann gemeinsam zu einer verminderten Replikation und so zu einer Reduktion der Plaques geführt haben.

## Fazit

Das DiCre-System bietet durch die Exzision von Fd die Möglichkeit der Herstellung eines Gen-Knockouts. Jedoch stellte sich heraus, dass Fd auf Proteinebene möglicherweise ~48 h stabil ist, so dass aufgrund der geringen Exzisionsrate von 20 % die nicht betroffenen parentalen DiCre-Parasiten die schwer beeinträchtigten Parasiten überwuchern. So ist es fraglich, ob mit Hilfe des DiCre-Systems der Nachweis gelingt, dass sich Fd als essentiell herausstellt. Die klonale Tachyzoitenkultur der *T. gondii* Fd Knockdown Mutante zeigte hingegen einen komplexen biochemischen Phänotyp. Die in dieser Arbeit festgestellten Auswirkungen der Fd Herabregulation beeinflussten insbesondere das Parasitenwachstum, wobei stets einige wenige Parasiten die Fd Defizienz überlebten und sich weiterhin vermehrten, wenn auch retardiert. Wegen des auf der einen Seite möglicherweise nach Fd-Gen Exzision noch vorhandenem Fd auf Proteinebene (Fd Knockout) und auf der anderen Seite einem womöglich unzureichend reprimierten Promoter und damit verbleibender geringer Fd Expression (Fd Knockdown) finden die vom Ferredoxin-Redoxsystem betroffenen Stoffwechselwege vermutlich weiterhin in einem geringen Maße statt. Womit das geringe Wachstum der Fd Knockdown Mutante zu erklären ist. Da Fd jedoch eine zentrale Rolle im Metabolismus des Apicoplasten einnehmen (siehe 1.2.1) und Elektronen an essentielle Stoffwechselwege, wie die Isoprenoid- und Fettsäuresynthese, liefern soll (siehe Abb. 3, Mazumdar *et al.* 2006, Nair *et al.* 2011), wird davon ausgegangen, dass bei der Verwendung eines geeigneten Systems zur Herstellung eines Knockouts bzw. der Zerstörung des Fd-Gens sich Fd als essentiell für das Parasitenwachstum erweist (siehe 5.3). So hat die Arbeitsgruppe von S. Lourido (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge MA, USA) mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems (näheres siehe 5.3) eine Vielzahl von Genen ermittelt, die sich voraussichtlich als essentiell für *T. gondii* erweisen. Durch persönliche Mitteilung von S. Lourido befindet sich auch Fd unter diesen Genen, so dass ein effizientes Fd Knockout-System, wie das CRISPR/Cas9-System einen robusten Phänotyp zeigen oder auch zum Absterben der Parasiten führen sollte.

Im Folgenden werden die Auswirkungen einer Fd Herabregulation in photosynthetisch-aktiven Organismen beschrieben und mit den erhaltenen Daten einer Fd Defizienz in *T. gondii* verglichen (siehe 5.2.1). Des Weiteren werden verschiedenen Metaboliten als mögliche Auslöser retrograder Signalkaskaden in Folge eines Fd Mangels vorgestellt (siehe 5.2.2). Für die Fd Knockdown Mutante sind dabei insbesondere Häm (siehe 5.2.2.1), oxidativer Stress (siehe 5.2.2.2) und MEcPP (siehe 5.2.2.3) von Interesse.

### 5.2.1 Auswirkungen einer Fd Defizienz in photosynthetisch-aktiven Organismen

Das Ferredoxin-Redoxsystem von Pflanzen ist, wie in 5.1.1 beschrieben, schon seit langem bekannt und dementsprechend auch gut untersucht; verschiedene Fd Knockout und Knockdown Untersuchungen unterschiedlicher photosynthetisch-aktiver Organismen wurden angefertigt und die Ergebnisse veröffentlicht. Fd vom Pflanzen-Typ (ptFd) zweier Cyanobakterien-Arten hat sich bereits als essentiell erwiesen: So konnte in *Synechocystis PCC6803* (Poncelet *et al.* 1998) und in *Plectonema boryanum* (Kimata-Arigo *et al.* 2000) ptFd nur nach Einbringen einer weiteren Kopie des entsprechenden Fds ausgeschaltet werden. Nach 60 % Herabregulation von ptFd einer Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree) durch Antisense-Technik wurde insbesondere eine deutlich reduzierte Photosyntheserate und ein geringerer Chlorophyll-Gehalt festgestellt (Holtgreve *et al.* 2003). In *A. thaliana* (Acker-Schmalwand) führte eine Fd Defizienz zu einer Wachstumsverlangsamung, einer Beeinträchtigung der Photosynthese sowie einem geringeren Chlorophyllgehalt der Blätter (Hanke und Hase 2008, Voss *et al.* 2008); ein ähnlicher Phänotyp ergab sich für einen Fd Knockdown einer Tabakpflanze (Blanco *et al.* 2011). Insgesamt zeigten alle untersuchten Organismen nach einer Fd Herabregulation starke Beeinträchtigungen des Wachstums und der Photosyntheserate. Photosynthetisch-aktive Organismen scheinen nicht mehr lebensfähig zu sein, wenn eine erforderliche Mindestmenge an Fd unterschritten wird (zusammengefasst in Pierella Karlusich *et al.* 2014).

Ein direkter Vergleich der Auswirkungen einer Herabregulation des nicht photosynthetisch-aktiven ptFd von *T. gondii* und dem ptFd aus photosynthetisch-aktiven Organismen ist nicht möglich. So sind in Pflanzen und insbesondere in Algen und auch in Cyanobakterien bis zu acht Isoformen von Fd vorhanden (Hanke und Mulo 2013). Ein Knockdown oder Knockout betrifft – je nach verwendeter Methode – gegebenenfalls nur eine Fd Isoform, so dass weitere Isoformen weiterhin ihre Funktion ausüben können. Jedoch ist derzeit nicht bekannt, ob die verschiedenen Isoformen tatsächlich unterschiedliche Funktionen ausüben (Kimata-Arigo *et al.* 2000), wie bei Fd1 und Fd2 in *A. thaliana* (linearer bzw. zyklischer Elektronenfluss; Hanke und Hase 2008), oder möglicherweise redundant sind (Hanke und Mulo 2013). *T. gondii* dagegen besitzt neben einem mitochondrialen Fd, wie es auch bei anderen Eukaryoten vorhanden ist (Seeber 2002), lediglich ein ptFd im Apicoplasten (Vollmer *et al.* 2001), so dass bei einem Knockdown oder Knockout die Fd Funktion nicht von einer weiteren Fd Isoform übernommen werden kann.

Es bleibt festzuhalten, dass eine Fd Herabregulation sowohl bei photosynthetisch-aktiven Organismen als auch im nicht photosynthetisch-aktiven Apicoplast von *T. gondii* eine

ausgeprägte Wirkung auf das Wachstum zur Folge hatte. Die Beeinträchtigung der mit dem Ferredoxin-Redoxsystem assoziierten Stoffwechselwegen wird als Ursache dafür angesehen (Seeber *et al.* 2005, Pierella Karlusich *et al.* 2014).

### **5.2.2 Ist in *T. gondii* eine retrograde Signalkaskade vorhanden, die das Überleben der Parasiten bei einer Fd Defizienz sichert?**

Zur Aufrechterhaltung der vom Ferredoxin-Redoxsystem abhängigen Stoffwechselwege kann der womöglich ungenügend reprimierte Promoter im Fd Knockdown oder noch vorhandenes Fd auf Proteinebene nach Exzision des Fd-Gens im Fd Knockout ausreichend gewesen sein (siehe 5.2). Die Fd Repression kann aber auch zu einer retrograden Signalkaskade geführt haben, die eine veränderte Regulierung der Stoffwechselwege im Apicoplasten hervorgerufen hat. Bei einer retrograden Signalkaskade wird die Genexpression des Nukleus aufgrund erhaltener Signale vom Plastid verändert. Dieser Prozess läuft entgegengesetzt zur konventionellen, anterograden Regulation, bei der durch den Nukleus verschiedene Vorgänge im Plastid gesteuert werden (Singh *et al.* 2015). Das Ferredoxin-Redoxsystem befindet sich sowohl in Pflanzen als auch in *T. gondii* in einem Plastid, dem Chloroplasten bzw. Apicoplast, welche den gleichen Ursprung haben. So ist der Chloroplast durch eine primäre Endosymbiose durch Aufnahme eines Cyanobakteriums durch eine Eukaryotenzelle hervorgegangen (Sagan 1967) und ähnelt daher dem ebenfalls durch eine (sekundäre) Endosymbiose entstandenen Apicoplasten (siehe 1.2, McFadden 2011). Im Verlauf der Evolution sind viele Gene des Chloroplasten bzw. Apicoplasten verloren gegangen, viele andere wurden zum Nukleus transferiert, weshalb verschiedenste Proteine zu unterschiedlichen Stoffwechselwegen zu den Plastiden transferiert werden (Archibald und Keeling 2002, Seeber *et al.* 2014). Die in den Plastiden noch vorhandenen Stoffwechselwege unterscheiden sich teils erheblich; ein im Zusammenhang mit dieser Arbeit jedoch hervorzuhebender gemeinsamer Stoffwechselweg beider Plastide ist die Isoprenoidsynthese des DOXP-Weges (auch Methylerythritolphosphat-Weg genannt, Phillips *et al.* 2008, Imlay und Odom 2014). Das retrograde Signalsystem wurde insbesondere in *A. thaliana* untersucht (Sauret-Gueto *et al.* 2006, Chi *et al.* 2015, Singh *et al.* 2015), wodurch verschiedene Metabolite bei Pflanzen identifiziert wurden, die ein retrogrades Signal bewirken (Chi *et al.* 2015, Singh *et al.* 2015). Sowohl Häm als auch der Redoxstatus des Chloroplasten werden als mögliche retrograde Signale diskutiert (siehe 5.2.2.1 und 5.2.2.2, Chi *et al.* 2015, Singh *et al.* 2015). Auch ein Zwischenprodukt der Isoprenoidsynthese, MEcPP, ist als retrograder Metabolit bekannt (siehe 5.2.2.3, Xiao *et al.* 2012). Die genannten Faktoren sind von

besonderem Interesse, da deren Synthese (teilweise oder komplett) ebenfalls im Apicoplasten stattfinden bzw. das Ferredoxin-Redoxsystem als einzig bekanntes Redoxsystem des Apicoplasten dort lokalisiert ist (Seeber und Soldati-Favre 2010). Eine Fd Defizienz und deren Auswirkungen könnten so möglicherweise retrograde Signalkaskaden auslösen und ein Absterben der Parasiten durch eine veränderte Genexpression verzögern.

### 5.2.2.1 Häm, ein retrograder Metabolit im Apicoplasten?

Häme stellen zyklische Tetrapyrrole dar, welche als Zentralatom Eisen gebunden haben. In Pflanzen findet die Tetrapyrrolsynthese vorwiegend im Chloroplasten statt, die in höheren Pflanzen auch als Ausgangsprodukte dreier weiterer Klassen von Tetrapyrrolen dienen (Chlorophyll, Sirohäm, Phytochromobilin; Tanaka und Tanaka 2007). Bei Störungen der Tetrapyrrolsynthese bewirkt Häm als retrograder Metabolit eine Aktivierung von Photosynthese-assoziierten Genen im Nukleus (Susek *et al.* 1993, Strand *et al.* 2003, Woodson *et al.* 2011). Eine Beteiligung von Ferredoxin ist jedoch nicht gegeben. Im Gegensatz zur Hämsynthese in den Chloroplasten von Pflanzen und den Mitochondrien von Tieren ist die Hämsynthese der Apicomplexa auf mehrere Zellkompartimente bzw. Organellen verteilt: So finden verschiedene Schritte der Synthese im Apicoplasten, im Mitochondrium und im Zytosol statt (van Dooren *et al.* 2012). Die Lokalisation und auch das Vorhandensein der entsprechend benötigten Enzyme des Häm-Metabolismus unterscheiden sich innerhalb der Apicomplexa und so auch in *P. falciparum* und *T. gondii*. Verschiedene Daten belegen jedoch, dass in den beiden letzten genannten Apicomplexa eine Häm-Synthese stattfindet (zusammengefasst in Seeber und Soldati-Favre 2010), wo Häm im letzten Schritt in den Mitochondrien gebildet wird. Dort dient es vornehmlich als prosthetische Gruppe verschiedener Proteine in der mitochondrialen Elektronentransportkette (van Dooren *et al.* 2012).

Der Häm-Abbau zur Rückgewinnung des Eisen-Zentralatoms geschieht im Allgemeinen durch Häm-Oxygenasen (HO), wobei zudem Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid entsteht (Kikuchi *et al.* 2005). *P. falciparum* besitzt ein HO-ähnliches Enzym, welches aufgrund einer vermutlich vorhandenen Targetingsequenz im Apicoplasten lokalisiert ist (Okada 2009). Soweit bekannt wird Häm für Proteine des Apicoplasten nicht benötigt, jedoch könnte dort das Eisen für Enzyme und andere Eisen-abhängige Stoffwechselwege verwendet werden (van Dooren *et al.* 2012). Bei *in vitro* Untersuchungen zeigte das HO-ähnliche Enzym von *P. falciparum* in Gegenwart von Fd als Elektronendonator HO-Aktivität (Okada 2009, Sartorello *et al.* 2010). Demnach ist eine Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems am



Häm-Abbau in *P. falciparum* denkbar. Auch *T. gondii* besitzt laut van Dooren *et al.* 2012 ein Homolog des *P. falciparum* HO-Enzyms. Häm dient so möglicherweise als Eisenlieferant im Apicoplasten und wird daher in das Plastid überführt. Die HO bzw. ein HO-ähnliches Enzym könnte dort entsprechend unter Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems Eisen aus Häm gewinnen, welches wiederum bei der [Fe-S]-Cluster Synthese benötigt wird (van Dooren *et al.* 2012). Experimentelle Beweise für diese Thesen existieren derzeit jedoch nicht. Als Folge einer Fd Defizienz wäre dann die Akkumulation von Häm im Apicoplasten denkbar. Dieses wiederum könnte als retrogrades Signal, wie in Chloroplasten von Pflanzen, die Genexpression des Nukleus beeinflussen, um den Metabolismus im Apicoplasten aufrechtzuerhalten.

#### 5.2.2.2 Oxidativer Stress im Apicoplasten als mögliches retrogrades Signal

Der in den Thylakoiden der Chloroplasten von Pflanzen stattfindende Elektronentransport während der Photosynthese kann leicht zu Veränderungen des Redoxstatus im Organell führen. Aufgrund der Komplexität der ablaufenden Prozesse und der damit verbundenen potentiellen Ursachen eines modulierten Redoxstatus resultieren eine Vielzahl unterschiedlicher Quellen retrograder Signalkaskaden, die die Expression verschiedener Gene im Nukleus regulieren (Baier und Dietz 2005, Singh *et al.* 2015). So ist das Fd1-Gen direkt betroffen, welches in *A. thaliana* für Fd1 kodiert und bei linearen Elektronenfluss involviert ist (Hanke und Hase 2008). Änderungen der Lichtverhältnisse oder der Tag/Nacht-Wechsel beeinflusst die Stabilität der Fd1 mRNA, so dass die Translation von Fd1 verändert wird (Petracek *et al.* 1998). Neben weiteren Redox-Dysbalancen stellen Sauerstoffradikale als auch das durch die Superoxid-Dismutase (SOD) gebildete Wasserstoffperoxid retrograde Signale dar, die nach Absorption von sehr viel Licht unter natürlichen physiologischen Bedingungen entstehen (Asada 2006). Unter solchen Umständen kann ROS (*reactive oxygen species*) entstehen und als Signal für eine veränderte Genexpression dienen, wodurch die Bildung von Superradikalen und Wasserstoffperoxid bewirkt wird (Rossel *et al.* 2002, Kimura *et al.* 2003, Takahashi *et al.* 2004). Dabei werden insbesondere antioxidative Enzyme aktiviert, wie die Glutathion Reduktase (GR), Glutathion (GSH) und SOD, die der Akkumulation von ROS entgegenwirken (Baier und Dietz 2005, Heiber *et al.* 2007). Die durch einen veränderten Redoxstatus verursachten retrograden Signalkaskaden in photosynthetisch-aktiven Organismen werden vornehmlich durch Photosynthese-assoziierte Prozesse ausgelöst (Singh *et al.* 2015). Elektronentransportketten, wie sie bei der Photosynthese ablaufen, finden im nicht photosynthetisch-aktiven Apicoplast in diesem Ausmaß nicht statt. Dagegen sind

Elektronentransfer-Reaktionen, die voraussichtlich mit Hilfe des Ferredoxin-Redoxsystems in den verschiedenen Stoffwechselwegen (Isoprenoidsynthese, Liponsäuresynthese) übertragen werden, ebenso notwendig. Wird das einzig bekannte Redoxsystem des Apicoplasten, das Ferredoxin-Redoxsystem, aufgrund einer Fd Defizienz gestört, kann dies vermutlich allein zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress führen (Gisselberg *et al.* 2013). Zudem ist das Ferredoxin-Redoxsystem - neben der Isoprenoid- und Liponsäuresynthese - vermutlich auch an der Übertragung von Reduktionäquivalenten in verschiedenen Schritten der [Fe-S]-Cluster Synthese beteiligt (Seeber *et al.* 2005, Seeber und Soldati-Favre 2010). Bedingt durch eine Fd Herabregulation kann eine Störung der [Fe-S]-Cluster Synthese möglicherweise zu sogenanntem Eisen-Stress führen, der wiederum die Entstehung von ROS hervorruft (Pino *et al.* 2007). Auch die oben postulierte Bildung von Eisen aus Häm kann an einem möglichen Eisen-Stress beteiligt sein. Die dadurch verursachte Bildung von ROS könnte auch hier als retrogrades Signal fungieren.

Wie eingangs für Chloroplasten von photosynthetisch-aktiven Organismen bereits genannt, existieren auch im Apicoplasten von Apicomplexa, wie *T. gondii* und *P. falciparum*, antioxidative Enzyme, die der Bildung von oxidativen Stress entgegenwirken. Im Vergleich zu antioxidativen Vorgängen in den Chloroplasten oder im Zytosol der Parasiten ist dagegen wenig über die Abläufe im Apicoplasten bekannt (Ding *et al.* 2004, Mohring *et al.* 2014, Bosch *et al.* 2015). In *P. falciparum* konnte die Apicoplasten-Lokalisation von GR, zweier Glyoxalase-verwandter Proteine, der Glutathion Peroxidase-ähnlichen Thioredoxin Peroxidase sowie von Peroxiredoxin bestimmt werden (Sztajer *et al.* 2001, Kehr *et al.* 2010, Urscher *et al.* 2010). Es handelt sich dabei um Redox-assoziierte Enzyme, die teilweise, wie z.B. GR, antioxidativ-wirksam sind (Kehr *et al.* 2010). Weniger als retrogrades Signal, aber eine mögliche Reaktion auf das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid, welches ebenfalls aufgrund von oxidativen Stress entsteht, ist die Modulation der Aktivität von FNR bei *P. falciparum* durch Monomer-Dimer-Wechsel ausgelöst durch Wasserstoffperoxid oder GSH zu nennen (Balconi *et al.* 2009). Auch für *T. gondii* ist eine Apicoplasten-Lokalisation weiterer antioxidativer Enzyme beschrieben: So sind zum einen eine SOD2 und zum anderen zwei putative Thioredoxin-abhängige Peroxidasen im Apicoplasten detektiert worden (Pino *et al.* 2007). Unter physiologischen Bedingungen kann der Entstehung von oxidativen Stress, wie ROS, Wasserstoffperoxid und Superoxidradikalen, mit Hilfe dieser Enzyme begegnet werden. Der durch eine Fd Defizienz zusätzlich ausgelöste oxidative Stress könnte trotz vorhandener antioxidativer Mechanismen als Auslöser einer retrograden Signalkaskade dienen. Welche Mechanismen dann wirksam werden, kann mit der Hilfe der Erkenntnisse

über Pflanzen nicht übertragen werden, da dort in Folge von oxidativen Stress Photosynthese-assoziierte Gene aktiviert werden (Singh *et al.* 2015), die in Apicomplexa nicht vorhanden sind.

Für *T. gondii* und auch *P. falciparum* wird bisher angenommen, dass es sich beim Ferredoxin-Redoxsystem um das einzige in diesem Plastid vorhandene Redoxsystem handelt (Seeber und Soldati-Favre 2010). Die bisher beschriebenen antioxidativen Enzyme mit Apicoplasten-Lokalisation stellen im Cytosol von *P. falciparum* und auch *T. gondii* Bestandteile von Redoxsystemen wie dem Glutathion- samt Glyoxalase-System und dem Thioredoxin-System dar (Mohring *et al.* 2014, Bosch *et al.* 2015). Für *P. falciparum* sind derzeit aufgrund der oben benannten Enzyme mehr Komponenten bekannt, die ein Vorhandensein zumindest eines Glutathion-Redoxsystems zum Abbau von oxidativen Stress im Apicoplasten vermuten lassen (Goyal *et al.* 2012). Dies ist derzeit jedoch eine rein spekulative Annahme, die auf keinen experimentellen Daten beruht. Es existieren zudem keine Belege, die ein Vorkommen eines weiteren Redoxsystems im Apicoplasten von *T. gondii* dokumentieren.

### 5.2.2.3 Wird durch MEcPP eine retrograde Signalkaskade ausgelöst?

Bei dem im Hinblick auf den Fd Knockdown in *T. gondii* möglicherweise relevantesten retrograden Molekül handelt es sich um MEcPP. Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, findet sowohl in Chloroplasten von Pflanzen als auch im Apicoplast die Isoprenoidsynthese des DOXP-Weges statt, wobei MEcPP als Zwischenprodukt während der Synthese der Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP gebildet wird (Phillips *et al.* 2008, Imlay und Odom 2014). Das HDS-Gen in Pflanzen kodiert für die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase (entspricht GcpE in *T. gondii*, siehe Abb. 4), welche die Umwandlung von MEcPP in HMBPP bewirkt. Eine Mutation im HDS-Gen von *A. thaliana* als auch Verletzungen der Pflanzen und helles Licht führten zu einem hohen MEcPP-Level, welches als retrogrades Signal die Expression im Nukleus kodierter, Stress-abhängiger Gene bewirkte (Xiao *et al.* 2012). Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten retrograden Signalen (Häm und oxidativer Stress) findet hier keine Aktivierung von Photosynthese-assoziierten Genen statt (Xiao *et al.* 2012). Auch in *E. coli* konnte bereits als Reaktion auf oxidativen Stress ein Anstieg von MEcPP dokumentiert werden (Ostrovsky *et al.* 1992, Ostrovsky *et al.* 1998), was auf eine Art konservierten Metaboliten als Stress-Reaktion hindeutet (Xiao *et al.* 2012). In *P. falciparum* handelt es sich bei MEcPP um dasjenige Zwischenprodukt, welches durch GcpE im vorletzten Schritt der Isoprenoidsynthese des DOXP-Weges unter der voraussichtlichen Beteiligung des Ferredoxin-Redoxsystems zu HMBPP umgewandelt wird;

HMBPP wiederum reagiert durch LytB und der dabei stattfindenden Elektronenübertragung durch das Ferredoxin-Redoxsystem zu IPP, das neben DMAPP eines der beiden Isoprenoidvorstufen darstellt (siehe Abb. 4, Rohrich *et al.* 2005). Für *T. gondii* wird angenommen, dass die Isoprenoidsynthese ebenso verläuft, da sämtliche Gene mit der entsprechenden Targetingsequenz für den Apicoplast vorhanden sind (Seeber und Soldati-Favre 2010). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Motilitätsassays gezeigt werden, dass die Isoprenoidsynthese der Fd Knockdown Mutante beeinträchtigt ist (siehe 4.3.5). Ein Ausbleiben der Isoprenoidsynthese soll wegen des Verlusts einer N-Glykosylierung des GAP50-Proteins (Komponente des Multiprotein-Komplexes der Gleit-Fortbewegung, Fauquenoy *et al.* 2011) zu einer massiven Beeinträchtigung der Motilität von *T. gondii* führen (Vortrag B. Striepen „Using genetics to study *Toxoplasma* and *Cryptosporidium*“, *International Congress of Coccidiosis 2014*, Dresden). Eine Akkumulation von MEcPP aufgrund einer gestörten Isoprenoidsynthese nach Fd Herabregulation scheint wahrscheinlich und könnte so als retrogrades Signal die Expression von im Nukleus kodierten Genen verursachen, die eine Gegenregulation der betroffenen Stoffwechselwege bewirken würden.

Ein im Zusammenhang mit der Isoprenoidsynthese des DOXP-Weges durch eine retrograde Signalkaskade aktivierbares Enzym in *P. falciparum* könnte eine zytosolische Zuckerphosphatase sein (PfHAD1, Guggisberg *et al.* 2014). Diese zytosolische Zuckerphosphatase dient als negativer Regulator der DOXP-Isoprenoidsynthese, indem Zwischenprodukte der Glykolyse dephosphoryliert werden. Durch die Dephosphorylierung kommt es zu einer Abnahme der Verfügbarkeit dieser Produkte als Substrate für die Isoprenoidsynthese im Apicoplasten von *P. falciparum* (Guggisberg *et al.* 2014). Bei Vorliegen einer Fd Defizienz kommt es möglicherweise zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten der Isoprenoidsynthese, wie z.B. MEcPP, was zu einer Repression des entsprechenden Gens der Zuckerphosphatase führen könnte. Dies würde ein vermehrtes Bereitstellen von Substraten für die Isoprenoidsynthese ermöglichen, um die Isoprenoidsynthese aufrechtzuerhalten. Es ist jedoch nicht bekannt, ob in *T. gondii* oder anderen Apicomplexa ein Homolog der Zuckerphosphatase vorhanden ist. Lediglich in *E. coli* wird vermutet, dass ein Ortholog dieses Enzyms existiert (Kang *et al.* 2005).

Wie in 5.2 beschrieben, hat die Fd Defizienz weitreichende Auswirkungen auf das Parasitenwachstum, führt jedoch nicht zum vollständigen Absterben der Fd Knockdown Mutante. Dies widerspricht den Veröffentlichungen der ebenfalls mit dem Tet-induzierbaren System erhaltenen Knockdowns von DOXPRI, LytB oder ACP, wo sich die jeweiligen Proteine nach Herabregulation der Gene als essentiell für das Überleben der Parasiten

herausgestellt haben (siehe Abb. 3, Mazumdar *et al.* 2006, Nair *et al.* 2011). Im Vergleich zum Fd Knockdown, wo mehrere Stoffwechselwege betroffen sind, ist es erstaunlich, dass sich die Proteine dieser Knockdowns, mit jeweils nur einem betroffenen Stoffwechselweg (Isoprenoid- oder Fettsäuresynthese), als essentiell erwiesen haben. Eine retrograde Signalkaskade aufgrund der Akkumulation von MEcPP hätte zumindest bei diesem Stamm zum Tragen kommen müssen (siehe Abb. 3). Die in Nair *et al.* 2011 gezeigten Daten des generierten LytB Knockdowns belegen nicht zweifelsfrei das Absterben der Parasiten nach ATc-Induktion. Mit Hilfe eines Kristallviolett-gefärbten Plaqueassays ist nicht ersichtlich, ob sich infizierte Bereiche im Zellrasen befinden, die jedoch zu keinen sichtbaren Plaques geführt haben (siehe 4.3.3), und so weiterhin sehr langsam wachsende Parasiten vorhanden sind. Zudem ist durchaus nach ATc-Induktion (ohne ATc-Vorbehandlung) innerhalb der ersten sieben Tage geringes Wachstum im Fluoreszenz-Wachstumsassay auszumachen. Insgesamt ist es demnach durchaus denkbar, dass auch dort ein retardiertes Wachstum durch geringe Expression und/oder retrograder Signalkaskaden weiterhin stattfindet. Mit Hilfe des Replikationsassays (siehe 4.3.4) als auch der Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen eines Plaques (siehe 4.3.7) konnte für den Fd Knockdown Wachstum bzw. keine morphologischen Veränderungen der Parasiten auch nach 6 d ATc-Induktion ausgemacht werden.

#### 5.2.2.4 Fazit

Das Vorhandensein von retrograden Signalen in *T. gondii* ist derzeit lediglich spekulativ, da bislang keine experimentellen Daten darüber in *T. gondii* vorliegen. Chloroplasten wurden dagegen hinsichtlich der bereits beschriebenen retrograden Signalkaskaden in einem hohen Maße untersucht, wobei die genauen Mechanismen der regulatorischen Prozesse häufig dennoch unbekannt sind (Chi *et al.* 2015, Singh *et al.* 2015). Angesichts des Ursprungs von Chloroplast und Apicoplast sind für den Apicoplasten retrograde Signalkaskaden vorstellbar, zumal für *P. falciparum* zumindest MEcPP als retrogrades Signale diskutiert wird (Xiao *et al.* 2012). Auch für Häm wird diese Möglichkeit in Betracht gezogen (van Dooren *et al.* 2012). Aufgrund der betroffenen Stoffwechselwege bei einer Fd Defizienz ist es durchaus möglich, dass retrograde Signalkaskaden durch eine Akkumulation von Zwischenprodukten (z.B. MEcPP) ausgelöst werden. Neben möglicherweise existierenden retrograden Signalkaskaden könnten aufgrund unzureichender Repression gering vorhandene Mengen an Fd das Überleben der Parasiten bei einer Fd Defizienz in der Fd Knockdown Mutante gesichert haben (siehe 5.2). Diese Mechanismen könnten zudem das Wachstum des Fd Knockout-Stammes 48 h nach Fd-Gen Exzision begründen, da Fd vermutlich auf Proteinebene zu

diesem Zeitpunkt in geringem Maße noch vorhanden ist (siehe 5.2). Beim Fd Knockout-Stamm sind weitere Untersuchungen zwingend erforderlich (siehe 5.3).

### 5.3 Ausblick

*T. gondii* besitzt ein Plastid-ähnliches Organell, den Apicoplasten, in welchem sich das darin einzig bekannte Redoxsystem, bestehend aus der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase und Ferredoxin (Fd), befindet. Das Ferredoxin-Redoxsystem nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus des Apicoplasten ein; so liefert Fd als Elektronendonator an mindestens zwei essentielle Stoffwechselwege Elektronen: Zum einen, wie in dieser Arbeit gezeigt, an LipA, ein Enzym der Liponsäuresynthese (Frohnecke *et al.* 2015), und zum anderen an die Isoprenoidsynthese, was in der Vergangenheit bereits für *P. falciparum* gezeigt werden konnte (Rohrich *et al.* 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des bakteriellen *Reverse Two-Hybrid* Systems (RTHS) nachgewiesene Interaktion von Fd und LipA belegt eine direkte PPI, die für eine Elektronenübertragung nötig ist (Frohnecke *et al.* 2015). Das für Fd und LipA verwendete RTH System ermöglicht neben dem Nachweis der Interaktion eine Kombination mit einer zyklischen Peptidbank (SICLOPPS), wodurch ein Dissoziator der Interaktion entwickelt werden kann (siehe 5.1.2, Horswill *et al.* 2004). Nach erfolgreicher Optimierung des Selektionsmediums für stringente Screeningbedingungen (siehe 4.1.3) steht der generierte Fd-LipA RTHS-Stamm zur Kombination mit einer zyklischen Peptidbank zur Verfügung. Nach der Durchführung mehrerer Screeningrunden können Inhibitoren identifiziert und die Peptidsequenz der Inhibitoren ermittelt werden (Horswill und Benkovic 2006). Das Ausmaß der Inhibition kann, nachdem die Struktur der Dissoziatoren bekannt ist und die Peptide in ausreichender Menge nach Expression oder chemischer Synthese vorliegen, anhand analytischer Gelfiltration mit den gereinigten Proteinen Fd und LipA untersucht werden (Rohrich *et al.* 2005). Um die Auswirkungen der Inhibition von Fd und LipA zu analysieren und mit denen des Fd Knockdowns zu vergleichen, ist es u.a. von besonderem Interesse den Dissoziator direkt in *T. gondii* zu exprimieren. Adriana Preiß hat in der von mir betreuten Masterarbeit bereits die Split-Intein-Chemie, die zur Zyklisierung der Peptide verwendet wird, in *T. gondii* eingebracht und so die Apicoplasten-Lokalisation eines zyklischen YFP nachgewiesen (Preiß 2014). Im Gegensatz zur Fd Knockdown Mutante wäre bei der Inhibition der Fd-LipA-Interaktion, sofern der Dissoziator spezifisch ist, nur ein Stoffwechselweg betroffen und es somit möglich, die Auswirkungen auf diesen gesondert

untersuchen zu können. Inwiefern ein potentieller Wirkstoff mit einem Target im Apicoplasten, wie dem Ferredoxin-Redoxsystem, die Wirtszellmembran, die Membran der parasitophoren Vakuole, die Parasitenmembran und schließlich die vier den Apicoplasten umgebenden Membranen überwinden kann, muss durch geeignete Untersuchungen gezeigt werden. Jedoch sind bereits verschiedene Substanzen bekannt, die mit dem Target Apicoplast Wirkungen auf Apicomplexa zeigten (Wiesner und Seeber 2005). Darunter befindet sich das natürliche, makrozyklische Peptid Thiostrepton mit einer Größe von 1289 Da, was ungefähr 11-12 Aminosäuren entspricht und welches inhibitorische Effekte auf den Apicoplasten zeigte (Clough *et al.* 1999).

Neben den Interaktionsanalysen mit Hilfe des bakteriellen RTHS wurde zudem überprüft, ob Fd - als Bestandteil des voraussichtlich einzig vorhandenen, zentralen Redoxsystems des Apicoplasten - essentiell für das Überleben von *T. gondii* ist bzw. welche Auswirkungen eine Herabregulation der Fd-Expression auf *T. gondii* hat (siehe 5.2). Zur Überprüfung dieser These ist zum einen das DiCre Knockout-System zum Einsatz gekommen (Andenmatten *et al.* 2013) und zum anderen das Tet-induzierbare Knockdown-System (Meissner *et al.* 2002).

Das DiCre Knockout-System zur Exzision von Fd wurde erfolgreich etabliert, jedoch konnte trotz verschiedener Analysen nicht zweifelsfrei die Fd Exzision und somit auch die Folgen eines Fd Knockouts gezeigt werden (siehe 4.2). Hingegen konnten mittels des ebenfalls erfolgreich generierten Fd Knockdowns verschiedene Assays zur Ermittlung der Auswirkungen einer Fd Herabregulation angefertigt werden (siehe 4.3). Es zeigten sich u.a. drastische Konsequenzen auf das Wachstum der Parasiten, jedoch stellte sich Fd bei Verwendung des Tet-induzierbaren Systems widererwartend als nicht essentiell dar. Dies ist zum einen möglicherweise in einem ungenügend reprimierten Promoter und/oder zum anderen in gegenregulierenden retrograden Signalkaskaden begründet (siehe 5.2). Um eine verbleibende Restaktivität des Promoters zu überprüfen und somit geringe Mengen an exprimierten Fd zu detektieren, ist es zwingend erforderlich, wie in 5.2 beschrieben, eine RT-PCR durchzuführen. Das Knockdown-System eignet sich hervorragend dazu Auswirkungen einer Fd Herabregulation zu ermitteln. So kann der Fd Knockdown-Stamm dazu verwendet werden die mögliche Akkumulation der Intermediärmetabolite der Isoprenoidsynthese, wie insbesondere MEcPP – als potentieller Auslöser einer retrograden Signalkaskade (siehe 5.2.2.3), zu untersuchen. Durch Kopplung der Festphasenextraktion (SPE - *solid phase extraction*) und der UHPLC-MS (*Ultra High Performance Liquid Chromatograph*-Massenspektrometrie) ist es Zhou *et al.* 2012 gelungen die

Zwischenprodukte der Isoprenoidsynthese von *E. coli* Extrakten zu quantifizieren, was ebenso für *T. gondii* Extrakte des Fd Knockdown-Stammes interessant wäre.

Um weitere Auswirkungen der Fd Herabregulation auf die Fettsäuresynthese zu untersuchen, kann mit Hilfe der *thin layer chromatography* nach Saponifikation der entsprechenden Proben die zellulären Fettsäuren bestimmt werden (Ramakrishnan *et al.* 2015). Mit dieser Methode ist es zudem möglich Dolichole zu detektieren, dessen Gehalt nach Herabregulation der Isoprenoidsynthese erniedrigt ist (Vortrag B. Striepen „*Using genetics to study Toxoplasma and Cryptosporidium*“, *International Congress of Coccidiosis 2014*, Dresden).

Welche Konsequenzen eine Fd Defizienz auf eine *T. gondii*-Infektion hat, kann durch die Infektion von Mäusen mit dem Fd Knockdown-Stamm bestimmt werden (Huynh und Carruthers 2006, Mazumdar *et al.* 2006). Dabei wird die Zeitspanne bis zur lethalen Wirkung einer *T. gondii*-Infektion nach Fd Herabregulation (ATc-Gabe über das Trinkwasser) im Vergleich zum nicht-induzierten bzw. parental Stamm ermittelt. Aufgrund der festgestellten Wachstumsinhibition der Fd Knockdown Mutante *in vitro* wird erwartet, dass sich der Knockdown als weniger virulent erweist.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Fd Knockdown und Knockout Systemen konnten verschiedene Auswirkungen einer Fd Defizienz ermittelt werden, jedoch beherbergt jedes dieser Systeme unterschiedliche Limitationen, die in 5.2 aufgeführt sind. Eine weitere Alternative zur Elimination des Fd-Gens stellt das CRISPR/Cas9-System dar (Ishino *et al.* 1987, Jansen *et al.* 2002). Dieses hat bereits vielfach zur Modulation von DNA-Sequenzen eukaryotischer Zellen Anwendung gefunden (zusammengefasst in Mali *et al.* 2013, Sampson und Weiss 2014) und wurde zudem erfolgreich in *T. gondii* etabliert (Shen *et al.* 2014, Sidik *et al.* 2014). Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems werden Doppelstrangbrüche mit einer *small guide* RNA (sgRNA) an gewünschter Stelle im Genom vorgenommen, die durch den NHEJ *pathway* - meist fehlerhaft - wieder zusammengefügt werden, so dass das entsprechende Gen zerstört wird (Sampson und Weiss 2014). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass das Genom direkt bearbeitet werden kann und keine vorherige Generation von Konstrukten mit endogenen DNA-Abschnitten notwendig ist (Jimenez-Ruiz *et al.* 2014). Die Arbeitsgruppe von S. Lourido (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge MA, USA) untersuchte bereits in einem Screen mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems das *T. gondii* Genom unter Verwendung einer sgRNA-Bank, die sämtliche ~8200 Gene des Parasiten umfasste. Dabei wurde eine Vielzahl von Genen ermittelt, die sich als essentiell für *T. gondii* erwiesen haben, darunter auch Fd (Sidik *et al.* 2016). So dass ein effizientes Fd Knockout-System, wie das CRISPR/Cas9-System einen robusten Phänotyp zeigen sollte.



## 6. Literaturverzeichnis

- Afanador G. A., Muench S. P., McPhillie M., Fomovska A., Schon A., Zhou Y., Cheng G., Stec J., Freundlich J. S., Shieh H. M., Anderson J. W., Jacobus D. P., Fidock D. A., Kozikowski A. P., Fishwick C. W., Rice D. W., Freire E., McLeod R. und Prigge S. T. (2013). *Discrimination of potent inhibitors of Toxoplasma gondii enoyl-acyl carrier protein reductase by a thermal shift assay*. Biochemistry 52(51): 9155-9166.
- Ajioka J. W., Fitzpatrick J. M. und Reitter C. P. (2001). *Toxoplasma gondii genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy*. Expert Rev Mol Med 2001: 1-19.
- Aliverti A., Corrado M. E. und Zanetti G. (1994). *Involvement of lysine-88 of spinach ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in the interaction with ferredoxin*. FEBS Lett 343(3): 247-250.
- Aliverti A., Faber R., Finnerty C. M., Ferioli C., Pandini V., Negri A., Karplus P. A. und Zanetti G. (2001). *Biochemical and crystallographic characterization of ferredoxin-NADP(+) reductase from nonphotosynthetic tissues*. Biochemistry 40(48): 14501-14508.
- Aliverti A., Pandini V., Pennati A., de Rosa M. und Zanetti G. (2008). *Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP(+) reductases*. Arch Biochem Biophys 474(2): 283-291.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. und Lipman D. J. (1990). *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215(3): 403-410.
- Andenmatten N., Egarter S., Jackson A. J., Jullien N., Herman J. P. und Meissner M. (2013). *Conditional genome engineering in Toxoplasma gondii uncovers alternative invasion mechanisms*. Nat Methods 10(2): 125-127.
- Archibald J. M. und Keeling P. J. (2002). *Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution*. Trends in Genetics 18(11): 577-584.
- Asada K. (2006). *Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions*. Plant Physiol 141(2): 391-396.
- Baier M. und Dietz K. J. (2005). *Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology*. J Exp Bot 56(416): 1449-1462.
- Balconi E., Pennati A., Crobu D., Pandini V., Cerutti R., Zanetti G. und Aliverti A. (2009). *The ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase/ferredoxin electron transfer system of Plasmodium falciparum*. FEBS J 276(14): 3825-3836.
- Bargieri D. Y., Andenmatten N., Lagal V., Thiberge S., Whitelaw J. A., Tardieux I., Meissner M. und Menard R. (2013). *Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion*. Nat Commun 4: 2552.
- Baumeister S., Wiesner J., Reichenberg A., Hintz M., Bietz S., Harb O. S., Roos D. S., Kordes M., Friesen J., Matuschewski K., Lingelbach K., Jomaa H. und Seeber F. (2011). *Fosmidomycin uptake into Plasmodium and Babesia-infected erythrocytes is facilitated by parasite-induced new permeability pathways*. PLoS One 6(5): e19334.
- Bednarek A., Wiek S., Lingelbach K. und Seeber F. (2003). *Toxoplasma gondii: analysis of the active site insertion of its ferredoxin-NADP(+)-reductase by peptide-specific antibodies and homology-based modeling*. Exp Parasitol 103(1-2): 68-77.
- Belluti F., Perozzo R., Lauciello L., Colizzi F., Kostrewa D., Bisi A., Gobbi S., Rampa A., Bolognesi M. L., Recanatini M., Brun R., Scapozza L. und Cavalli A. (2013). *Design, synthesis, and biological and crystallographic evaluation of novel inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-ACP-reductase (PfFabI)*. J Med Chem 56(19): 7516-7526.
- Blanco N. E., Ceccoli R. D., Segretin M. E., Poli H. O., Voss I., Melzer M., Bravo-Almonacid F. F., Scheibe R., Hajirezaei M.-R. und Carrillo N. (2011). *Cyanobacterial flavodoxin*

- complements ferredoxin deficiency in knocked-down transgenic tobacco plants*. The Plant Journal 65(6): 922-935.
- Boomgaren M. (2012). *Entwicklung von Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reduktase-Inhibitoren als potentielle Arzneistoffe bei Apicomplexa-Infektionen*. Masterarbeit. Philipps Universität Marburg, Marburg.
- Bosch S. S., Kronenberger T., Meissner K. A., Zimbres F. M., Stegehake D., Izui N. M., Schettert I., Liebau E. und Wrenger C. (2015). *Oxidative stress control by apicomplexan parasites*. Biomed Res Int 2015: 351289.
- Brennan M. B. und Struhl K. (1980). *Mechanisms of increasing expression of a yeast gene in Escherichia coli*. J Mol Biol 136(3): 333-338.
- Buckingham J. (1993). in *Dictionary of Natural Products*, CRC Press.
- Buis J. M., Cheek J., Kalliri E. und Broderick J. B. (2006). *Characterization of an active spore photoproduct lyase, a DNA repair enzyme in the radical S-adenosylmethionine superfamily*. J Biol Chem 281(36): 25994-26003.
- Burg J. L., Perelman D., Kasper L. H., Ware P. L. und Boothroyd J. C. (1988). *Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii*. J Immunol 141(10): 3584-3591.
- Carballeira N. M., Bwalya A. G., Itoe M. A., Andricopulo A. D., Cordero-Maldonado M. L., Kaiser M., Mota M. M., Crawford A. D., Guido R. V. und Tasdemir D. (2014). *2-Octadecynoic acid as a dual life stage inhibitor of Plasmodium infections and plasmodial FAS-II enzymes*. Bioorg Med Chem Lett 24(17): 4151-4157.
- Ceccarelli E. A., Arakaki A. K., Cortez N. und Carrillo N. (2004). *Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases*. Biochim Biophys Acta 1698(2): 155-165.
- Chant A., Kraemer-Pecore C. M., Watkin R. und Kneale G. G. (2005). *Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the Aspergillus nidulans gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site*. Protein Expression and Purification 39(2): 152-159.
- Charron A. J. und Sibley L. D. (2002). *Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 115(Pt 15): 3049-3059.
- Cheng G., Muench S. P., Zhou Y., Afanador G. A., Mui E. J., Fomovska A., Lai B. S., Prigge S. T., Woods S., Roberts C. W., Hickman M. R., Lee P. J., Leed S. E., Auschwitz J. M., Rice D. W. und McLeod R. (2013). *Design, synthesis, and biological activity of diaryl ether inhibitors of Toxoplasma gondii enoyl reductase*. Bioorg Med Chem Lett 23(7): 2035-2043.
- Cheng L., Fu J., Tsukamoto A. und Hawley R. G. (1996). *Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells*. Nat Biotechnol 14(5): 606-609.
- Chi W., Feng P., Ma J. und Zhang L. (2015). *Metabolites and chloroplast retrograde signaling*. Curr Opin Plant Biol 25: 32-38.
- Clough B., Rangachari K., Strath M., Preiser P. R. und Wilson R. J. (1999). *Antibiotic inhibitors of organellar protein synthesis in Plasmodium falciparum*. Protist 150(2): 189-195.
- Connolly J. D. und Hill R. A. (1992). in *Dictionary of Terpenoids*, Chapman and Hall.
- Coppens I., Asai T. und Tomavo S. (2014). *Biochemistry and Metabolism of Toxoplasma gondii: Carbohydrates, Lipids and Nucleotides*. in Weiss L. M. und Kim K. *Toxoplasma gondii* Elsevier / Academic Press. 2: 257-295.
- Crawford M. J., Thomsen-Zieger N., Ray M., Schachtner J., Roos D. S. und Seeber F. (2006). *Toxoplasma gondii scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast*. EMBO J 25(13): 3214-3222.

- Crobu D., Canevari G., Milani M., Pandini V., Vanoni M. A., Bolognesi M., Zanetti G. und Aliverti A. (2009). *Plasmodium falciparum ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase His286 plays a dual role in NADP(H) binding and catalysis*. Biochemistry 48(40): 9525-9533.
- Decottignies P., Le Marechal P., Jacquot J. P., Schmitter J. M. und Gadal P. (1995). *Primary structure and post-translational modification of ferredoxin-NADP reductase from Chlamydomonas reinhardtii*. Arch Biochem Biophys 316(1): 249-259.
- Di Lallo G., Castagnoli L., Ghelardini P. und Paolozzi L. (2001). *A two-hybrid system based on chimeric operator recognition for studying protein homo/heterodimerization in Escherichia coli*. Microbiology 147(Pt 6): 1651-1656.
- Ding M., Kwok L. Y., Schluter D., Clayton C. und Soldati D. (2004). *The antioxidant systems in Toxoplasma gondii and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury*. Mol Microbiol 51(1): 47-61.
- Donald R. G., Carter D., Ullman B. und Roos D. S. (1996). *Insertional tagging, cloning, and expression of the Toxoplasma gondii hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation*. J Biol Chem 271(24): 14010-14019.
- Donald R. G. und Roos D. S. (1995). *Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A 92(12): 5749-5753.
- Douglas P., Kriek M., Bryant P. und Roach P. L. (2006). *Lipoyl Synthase Inserts Sulfur Atoms into an Octanoyl Substrate in a Stepwise Manner*. Angewandte Chemie 118(31): 5321-5323.
- Dubey J. P., Lindsay D. S. und Speer C. A. (1998). *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*. Clin Microbiol Rev 11(2): 267-299.
- Dudley K. H., Ehrenberg A., Hemmerich P. und Müller F. (1964). *Spektren und Strukturen der am Flavin-Redoxsystem beteiligten Partikeln. Studien in der Flavinreihe IX [1]*. Helvetica Chimica Acta 47(5): 1354-1383.
- Egarter S., Andenmatten N., Jackson A. J., Whitelaw J. A., Pall G., Black J. A., Ferguson D. J., Tardieux I., Mogilner A. und Meissner M. (2014). *The toxoplasma Acto-MyoA motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion*. PLoS One 9(3): e91819.
- Entzeroth R., Mattig F. R. und Werner-Meier R. (1998). *Structure and function of the parasitophorous vacuole in Eimeria species*. Int J Parasitol 28(7): 1015-1018.
- Fan H., Villegas C., Chan A. K. und Wright J. A. (1998). *Myc-epitope tagged proteins detected with the 9E10 antibody in immunofluorescence and immunoprecipitation assays but not in western blot analysis*. Biochem Cell Biol 76(1): 125-128.
- Fauquenoy S., Hovasse A., Sloves P. J., Morelle W., Dilezitoko Alayi T., Slomianny C., Werkmeister E., Schaeffer C., Van Dorsselaer A. und Tomavo S. (2011). *Unusual N-glycan structures required for trafficking Toxoplasma gondii GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility*. Mol Cell Proteomics 10(9): M111 008953.
- Ferguson D. J. P. und Dubremetz J. F. (2014). *The Ultrastructure of Toxoplasma gondii*. in Weiss L. M. und Kim K. Toxoplasma gondii Elsevier / Academic Press. 2: 19-59.
- Fichera M. E., Bhopale M. K. und Roos D. S. (1995). *In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother 39(7): 1530-1537.
- Fichera M. E. und Roos D. S. (1997). *A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites*. Nature 390(6658): 407-409.

- Foust G. P., Mayhew S. G. und Massey V. (1969). *Complex formation between ferredoxin triphosphopyridine nucleotide reductase and electron transfer proteins*. J Biol Chem 244(3): 964-970.
- Fox B. A., Ristuccia J. G., Gigley J. P. und Bzik D. J. (2009). *Efficient gene replacements in Toxoplasma gondii strains deficient for nonhomologous end joining*. Eukaryot Cell 8(4): 520-529.
- Fred R. B. und Knight S. G. (1949). *The Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride by Penicillium chrysogenum*. Science 109(2825): 169-170.
- Frenal K., Kemp L. E. und Soldati-Favre D. (2014). *Emerging roles for protein S-palmitoylation in Toxoplasma biology*. Int J Parasitol 44(2): 121-131.
- Frenal K., Tay C. L., Mueller C., Bushell E. S., Jia Y., Graindorge A., Billker O., Rayner J. C. und Soldati-Favre D. (2013). *Global analysis of apicomplexan protein S-acyl transferases reveals an enzyme essential for invasion*. Traffic 14(8): 895-911.
- Frohnecke N., Klein S. und Seeber F. (2015). *Protein-protein interaction studies provide evidence for electron transfer from ferredoxin to lipoic acid synthase in Toxoplasma gondii*. FEBS Lett 589(1): 31-36.
- Fugate C. J. und Jarrett J. T. (2012). *Biotin synthase: insights into radical-mediated carbon-sulfur bond formation*. Biochim Biophys Acta 1824(11): 1213-1222.
- Gallagher J. R. und Prigge S. T. (2010). *Plasmodium falciparum acyl carrier protein crystal structures in disulfide-linked and reduced states and their prevalence during blood stage growth*. Proteins 78(3): 575-588.
- Gardner M. J., Bates P. A., Ling I. T., Moore D. J., McCready S., Gunasekera M. B., Wilson R. J. und Williamson D. H. (1988). *Mitochondrial DNA of the human malarial parasite Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 31(1): 11-17.
- Gardner M. J., Feagin J. E., Moore D. J., Rangachari K., Williamson D. H. und Wilson R. J. (1993). *Sequence and organization of large subunit rRNA genes from the extrachromosomal 35 kb circular DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res 21(5): 1067-1071.
- Gardner M. J., Feagin J. E., Moore D. J., Spencer D. F., Gray M. W., Williamson D. H. und Wilson R. J. (1991a). *Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 48(1): 77-88.
- Gardner M. J., Williamson D. H. und Wilson R. J. (1991b). *A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts*. Mol Biochem Parasitol 44(1): 115-123.
- Gershenzon J. und Dudareva N. (2007). *The function of terpene natural products in the natural world*. Nat Chem Biol 3(7): 408-414.
- Gisselberg J. E., Dellibovi-Ragheb T. A., Matthews K. A., Bosch G. und Prigge S. T. (2013). *The suf iron-sulfur cluster synthesis pathway is required for apicoplast maintenance in malaria parasites*. PLoS Pathog 9(9): e1003655.
- Goel A., Colcher D., Koo J. S., Booth B. J., Pavlinkova G. und Batra S. K. (2000). *Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct*. Biochim Biophys Acta 1523(1): 13-20.
- Goldschmidt-Clermont M. und Bassi R. (2015). *Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions*. Curr Opin Plant Biol 25: 71-78.
- Goyal M., Alam A. und Bandyopadhyay U. (2012). *Redox regulation in malaria: current concepts and pharmacotherapeutic implications*. Curr Med Chem 19(10): 1475-1503.
- Gross U. (2004). *[Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 47(7): 692-697.

- Gross U., Bohne W., Soete M. und Dubremetz J. F. (1996). *Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of Toxoplasma gondii*. Parasitol Today 12(1): 30-33.
- Gross U., Roos T. und Friese K. (2001). *Toxoplasmose in der Schwangerschaft*. Deutsches Ärzteblatt 98(49): 3293-3300.
- Guggisberg A. M., Park J., Edwards R. L., Kelly M. L., Hodge D. M., Tolia N. H. und Odom A. R. (2014). *A sugar phosphatase regulates the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in malaria parasites*. Nat Commun 5: 4467.
- Hakansson S., Morisaki H., Heuser J. und Sibley L. D. (1999). *Time-lapse video microscopy of gliding motility in Toxoplasma gondii reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion*. Mol Biol Cell 10(11): 3539-3547.
- Haldimann A. und Wanner B. L. (2001). *Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria*. J Bacteriol 183(21): 6384-6393.
- Hanke G. und Mulo P. (2013). *Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism*. Plant Cell Environ 36(6): 1071-1084.
- Hanke G. T. und Hase T. (2008). *Variable photosynthetic roles of two leaf-type ferredoxins in arabidopsis, as revealed by RNA interference*. Photochem Photobiol 84(6): 1302-1309.
- Hanke G. T., Kurisu G., Kusunoki M. und Hase T. (2004). *Fd : FNR Electron Transfer Complexes: Evolutionary Refinement of Structural Interactions*. Photosynth Res 81(3): 317-327.
- Hanzelmann P., Hernandez H. L., Menzel C., Garcia-Serres R., Huynh B. H., Johnson M. K., Mendel R. R. und Schindelin H. (2004). *Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis*. J Biol Chem 279(33): 34721-34732.
- Harmer J. E., Hiscox M. J., Dinis P. C., Fox S. J., Iliopoulos A., Hussey J. E., Sandy J., Van Beek F. T., Essex J. W. und Roach P. L. (2014). *Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions*. Biochem J 464(1): 123-133.
- Heiber I., Stroher E., Raatz B., Busse I., Kahmann U., Bevan M. W., Dietz K. J. und Baier M. (2007). *The redox imbalanced mutants of Arabidopsis differentiate signaling pathways for redox regulation of chloroplast antioxidant enzymes*. Plant Physiol 143(4): 1774-1788.
- Herm-Gotz A., Agop-Nersesian C., Munter S., Grimley J. S., Wandless T. J., Frischknecht F. und Meissner M. (2007). *Rapid control of protein level in the apicomplexan Toxoplasma gondii*. Nat Methods 4(12): 1003-1005.
- Hodges M., Miginiac-Maslow M., Le Marechal P. und Remy R. (1990). *The ATP-dependent post translational modification of ferredoxin: NADP+ oxidoreductase*. Biochim Biophys Acta 1052(3): 446-452.
- Holtgreffe S., Bader K. P., Horton P., Scheibe R., von Schaewen A. und Backhausen J. E. (2003). *Decreased content of leaf ferredoxin changes electron distribution and limits photosynthesis in transgenic potato plants*. Plant Physiol 133(4): 1768-1778.
- Horchani H., Ouertani S., Gargouri Y. und Sayari A. (2009). *The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of Staphylococcus aureus lipase produced in Escherichia coli*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 61(3-4): 194-201.
- Horswill A. R. und Benkovic S. J. (2005). *Cyclic peptides, a chemical genetics tool for biologists*. Cell Cycle 4(4): 552-555.
- Horswill A. R. und Benkovic S. J. (2006). *Identifying small-molecule modulators of protein-protein interactions*. Curr Protoc Protein Sci Chapter 19: Unit 19 15.

- Horswill A. R., Savinov S. N. und Benkovic S. J. (2004). *A systematic method for identifying small-molecule modulators of protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(44): 15591-15596.
- Hunter C. A. und Sibley L. D. (2012). *Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors*. Nat Rev Microbiol 10(11): 766-778.
- Huynh M. H. und Carruthers V. B. (2006). *Toxoplasma MIC2 is a major determinant of invasion and virulence*. PLoS Pathog 2(8): e84.
- Huynh M. H. und Carruthers V. B. (2009). *Tagging of endogenous genes in a Toxoplasma gondii strain lacking Ku80*. Eukaryot Cell 8(4): 530-539.
- Iltzsch M. H. (1993). *Pyrimidine salvage pathways in Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 40(1): 24-28.
- Imlay L. und Odom A. R. (2014). *Isoprenoid metabolism in apicomplexan parasites*. Curr Clin Microbiol Rep 1(3-4): 37-50.
- Imlay L. S., Armstrong C. M., Masters M. C., Li T., Price K. E., Edwards R. L., Mann K. M., Li L. X., Stallings C. L., Berry N. G., O'Neill P. M. und Odom A. R. (2015). *Plasmodium IspD (2-C-Methyl-d-erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase), an Essential and Druggable Antimalarial Target*. ACS Infectious Diseases 1(4): 157-167.
- Inoue H., Nojima H. und Okayama H. (1990). *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene 96(1): 23-28.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. und Nakata A. (1987). *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J Bacteriol 169(12): 5429-5433.
- Jakimowicz P., Cheesman M. R., Bishai W. R., Chater K. F., Thomson A. J. und Buttner M. J. (2005). *Evidence that the Streptomyces developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster*. J Biol Chem 280(9): 8309-8315.
- Jansen R., Embden J. D., Gaastra W. und Schouls L. M. (2002). *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Mol Microbiol 43(6): 1565-1575.
- Jelenska J., Crawford M. J., Harb O. S., Zuther E., Haselkorn R., Roos D. S. und Gornicki P. (2001). *Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2723-2728.
- Jimenez-Ruiz E., Wong E. H., Pall G. S. und Meissner M. (2014). *Advantages and disadvantages of conditional systems for characterization of essential genes in Toxoplasma gondii*. Parasitology 141(11): 1390-1398.
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D. und Beck E. (1999). *Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs*. Science 285(5433): 1573-1576.
- Joung J. K., Ramm E. I. und Pabo C. O. (2000). *A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7382-7387.
- Jullien N., Goddard I., Selmi-Ruby S., Fina J. L., Cremer H. und Herman J. P. (2007). *Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre)*. PLoS One 2(12): e1355.
- Jullien N., Sampieri F., Enjalbert A. und Herman J. P. (2003). *Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments*. Nucleic Acids Res 31(21): e131.
- Kang M. J., Lee Y. M., Yoon S. H., Kim J. H., Ock S. W., Jung K. H., Shin Y. C., Keasling J. D. und Kim S. W. (2005). *Identification of genes affecting lycopene accumulation in Escherichia coli using a shot-gun method*. Biotechnol Bioeng 91(5): 636-642.
- Kehr S., Sturm N., Rahlfs S., Przyborski J. M. und Becker K. (2010). *Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites*. PLoS Pathog 6(12): e1001242.

- Kikuchi G., Yoshida T. und Noguchi M. (2005). *Heme oxygenase and heme degradation*. Biochem Biophys Res Commun 338(1): 558-567.
- Kim K., Soldati D. und Boothroyd J. C. (1993). *Gene replacement in Toxoplasma gondii with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker*. Science 262(5135): 911-914.
- Kimata-Arigo Y., Kurisu G., Kusunoki M., Aoki S., Sato D., Kobayashi T., Kita K., Horii T. und Hase T. (2007a). *Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from human malaria parasite*. J Biochem 141(3): 421-428.
- Kimata-Arigo Y., Matsumura T., Kada S., Fujimoto H., Fujita Y., Endo T., Mano J., Sato F. und Hase T. (2000). *Differential electron flow around photosystem I by two C(4)-photosynthetic-cell-specific ferredoxins*. EMBO J 19(19): 5041-5050.
- Kimata-Arigo Y., Saitoh T., Ikegami T., Horii T. und Hase T. (2007b). *Molecular interaction of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from human malaria parasite*. J Biochem 142(6): 715-720.
- Kimura M., Yamamoto Y. Y., Seki M., Sakurai T., Sato M., Abe T., Yoshida S., Manabe K., Shinozaki K. und Matsui M. (2003). *Identification of Arabidopsis genes regulated by high light-stress using cDNA microarray*. Photochem Photobiol 77(2): 226-233.
- Kohler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webster P., Wilson R. J., Palmer J. D. und Roos D. S. (1997). *A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites*. Science 275(5305): 1485-1489.
- Kuhn R. und Jerchel D. (1941). *Über Invertseifen, VIII. Mitteil.: Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 74: 949-952.
- Kurisu G., Kusunoki M., Katoh E., Yamazaki T., Teshima K., Onda Y., Kimata-Arigo Y. und Hase T. (2001). *Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase*. Nat Struct Biol 8(2): 117-121.
- Lanz N. D. und Booker S. J. (2012). *Identification and function of auxiliary iron-sulfur clusters in radical SAM enzymes*. Biochim Biophys Acta 1824(11): 1196-1212.
- Lanz N. D. und Booker S. J. (2015). *Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes*. Biochim Biophys Acta.
- Lehtimäki N., Koskela M. M., Dahlstrom K. M., Pakula E., Lintala M., Scholz M., Hippler M., Hanke G. T., Rokka A., Battchikova N., Salminen T. A. und Mulo P. (2014). *Posttranslational modifications of Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in Arabidopsis chloroplasts*. Plant Physiol 166(4): 1764-1776.
- Li M. Z. und Elledge S. J. (2007). *Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC*. Nat Methods 4(3): 251-256.
- Lim L., Linka M., Mullin K. A., Weber A. P. M. und McFadden G. I. (2010). *The carbon and energy sources of the non-photosynthetic plastid in the malaria parasite*. FEBS Lett 584(3): 549-554.
- Limenitakis J. und Soldati-Favre D. (2011). *Functional genetics in Apicomplexa: potentials and limits*. FEBS Lett 585(11): 1579-1588.
- Lorestani A., Sheiner L., Yang K., Robertson S. D., Sahoo N., Brooks C. F., Ferguson D. J., Striepen B. und Gubbels M. J. (2010). *A Toxoplasma MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis*. PLoS One 5(8): e12302.
- Lu P. und Feng M. G. (2008). *Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers*. Appl Microbiol Biotechnol 79(4): 579-587.
- Lucius R. und Loos-Frank B. (2008). in *Biologie von Parasiten*. Berlin Springer.
- Luo L., Greenwood J., Soucy E., Kim D. und Samuel A. (2010). *Making linear chemical gradients in agar*. The Worm Breeder's Gazette 18(3): 10-11.
- Luo Q., Upadhyaya R., Zhang H., Madrid-Aliste C., Nieves E., Kim K., Angeletti R. H. und Weiss L. M. (2011). *Analysis of the glycoproteome of Toxoplasma gondii using lectin*

- affinity chromatography and tandem mass spectrometry*. *Microbes Infect* 13(14-15): 1199-1210.
- Madela K., Banhart S., Zimmermann A., Piesker J., Bannert N. und Laue M. (2014). *A simple procedure to analyze positions of interest in infectious cell cultures by correlative light and electron microscopy*. *Methods Cell Biol* 124: 93-110.
- Maeda M., Lee Y. H., Ikegami T., Tamura K., Hoshino M., Yamazaki T., Nakayama M., Hase T. und Goto Y. (2005). *Identification of the N- and C-terminal substrate binding segments of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase by NMR*. *Biochemistry* 44(31): 10644-10653.
- Mali P., Esvelt K. M. und Church G. M. (2013). *Cas9 as a versatile tool for engineering biology*. *Nat Methods* 10(10): 957-963.
- Matsubara H., Wada K. und Masaki R. (1976). *Structure and function of chloroplast-type ferredoxins*. *Adv Exp Med Biol* 74: 1-15.
- Mazumdar J., E H. W., Masek K., C A. H. und Striepen B. (2006). *Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13192-13197.
- Mazumdar J. und Striepen B. (2007). *Make it or take it: fatty acid metabolism of apicomplexan parasites*. *Eukaryot Cell* 6(10): 1727-1735.
- McFadden G. I. (2011). *The apicoplast*. *Protoplasma* 248(4): 641-650.
- McLeod R., Muench S. P., Rafferty J. B., Kyle D. E., Mui E. J., Kirisits M. J., Mack D. G., Roberts C. W., Samuel B. U., Lyons R. E., Dorris M., Milhous W. K. und Rice D. W. (2001). *Triclosan inhibits the growth of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii by inhibition of apicomplexan Fab I*. *Int J Parasitol* 31(2): 109-113.
- Meijering E., Jacob M., Sarria J. C., Steiner P., Hirling H. und Unser M. (2004). *Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images*. *Cytometry A* 58(2): 167-176.
- Meissner M., Schluter D. und Soldati D. (2002). *Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion*. *Science* 298(5594): 837-840.
- Milani M., Balconi E., Aliverti A., Mastrangelo E., Seeber F., Bolognesi M. und Zanetti G. (2007). *Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from Plasmodium falciparum undergoes NADP<sup>+</sup>-dependent dimerization and inactivation: functional and crystallographic analysis*. *J Mol Biol* 367(2): 501-513.
- Mohring F., Pretzel J., Jortzik E. und Becker K. (2014). *The redox systems of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: comparison, in silico analyses and inhibitor studies*. *Curr Med Chem* 21(15): 1728-1756.
- Moolna A. und Bowsher C. G. (2010). *The physiological importance of photosynthetic ferredoxin NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) isoforms in wheat*. *J Exp Bot* 61(10): 2669-2681.
- Mueller C., Klages N., Jacot D., Santos J. M., Cabrera A., Gilberger T. W., Dubremetz J. F. und Soldati-Favre D. (2013). *The Toxoplasma protein ARO mediates the apical positioning of rhoptry organelles, a prerequisite for host cell invasion*. *Cell Host Microbe* 13(3): 289-301.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nair S. C., Brooks C. F., Goodman C. D., Sturm A., McFadden G. I., Sundriyal S., Anglin J. L., Song Y., Moreno S. N. und Striepen B. (2011). *Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 208(7): 1547-1559.
- Nardelli S. C., Che F. Y., Silmon de Monerri N. C., Xiao H., Nieves E., Madrid-Aliste C., Angel S. O., Sullivan W. J., Jr., Angeletti R. H., Kim K. und Weiss L. M. (2013). *The*



- histone code of Toxoplasma gondii comprises conserved and unique posttranslational modifications*. MBio 4(6): e00922-00913.
- Neidhardt F. C., Bloch P. L. und Smith D. F. (1974). *Culture medium for enterobacteria*. J Bacteriol 119(3): 736-747.
- Okada K. (2009). *The novel heme oxygenase-like protein from Plasmodium falciparum converts heme to bilirubin IX $\alpha$  in the apicoplast*. FEBS Lett 583(2): 313-319.
- Okada K. und Hase T. (2005). *Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin in Thermosynechococcus elongatus BP-1*. J Biol Chem 280(21): 20672-20679.
- Ostrovsky D., Diomina G., Lysak E., Matveeva E., Ogrel O. und Trutko S. (1998). *Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains*. Arch Microbiol 171(1): 69-72.
- Ostrovsky D., Kharatian E., Malarova I., Shipanova I., Sibeldina L., Shashkov A. und Tantsirev G. (1992). *Synthesis of a new organic pyrophosphate in large quantities is induced in some bacteria by oxidative stress*. Biofactors 3(4): 261-264.
- Panagou E. Z., Skandamis P. N. und Nychas G. J. (2005). *Use of gradient plates to study combined effects of temperature, pH, and NaCl concentration on growth of Monascus ruber van Tieghem, an Ascomycetes fungus isolated from green table olives*. Appl Environ Microbiol 71(1): 392-399.
- Pandini V., Caprini G., Tedeschi G., Seeber F., Zanetti G. und Aliverti A. (2006). *Roles of the species-specific subdomain and the N-terminal peptide of Toxoplasma gondii ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in ferredoxin binding*. Biochemistry 45(11): 3563-3571.
- Pandini V., Caprini G., Thomsen N., Aliverti A., Seeber F. und Zanetti G. (2002). *Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and ferredoxin of the protozoan parasite Toxoplasma gondii interact productively in Vitro and in Vivo*. J Biol Chem 277(50): 48463-48471.
- Pankowski A. und McMinn A. (2009). *Development of immunoassays for the iron-regulated proteins ferredoxin and flavodoxin in polar microalgae*. Journal of Phycology 45(3): 771-783.
- Perozzo R., Kuo M., Sidhu A., Valiyaveetil J. T., Bittman R., Jacobs W. R., Jr., Fidock D. A. und Sacchettini J. C. (2002). *Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase*. J Biol Chem 277(15): 13106-13114.
- Petracek M. E., Dickey L. F., Nguyen T. T., Gatz C., Sowinski D. A., Allen G. C. und Thompson W. F. (1998). *Ferredoxin-1 mRNA is destabilized by changes in photosynthetic electron transport*. Proc Natl Acad Sci U S A 95(15): 9009-9013.
- Pfefferkorn E. R. und Borotz S. E. (1994). *Toxoplasma gondii: characterization of a mutant resistant to 6-thioxanthine*. Exp Parasitol 79(3): 374-382.
- Phillips M. A., León P., Boronat A. und Rodríguez-Concepción M. (2008). *The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources*. Trends in Plant Science 13(12): 619-623.
- Pierella Karlusich J. J., Lodeyro A. F. und Carrillo N. (2014). *The long goodbye: the rise and fall of flavodoxin during plant evolution*. J Exp Bot 65(18): 5161-5178.
- Pino P., Foth B. J., Kwok L. Y., Sheiner L., Schepers R., Soldati T. und Soldati-Favre D. (2007). *Dual targeting of antioxidant and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog 3(8): e115.
- Plessmann U., Reiter-Owona I. und Lechtreck K. F. (2004). *Posttranslational modifications of alpha-tubulin of Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 94(5): 386-389.
- Poncelet M., Cassier-Chauvat C., Leschelle X., Bottin H. und Chauvat F. (1998). *Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in Synechocystis PCC6803 by plasmid shuffling*. Mol Microbiol 28(4): 813-821.

- Porter J. W. und Spurgeon S. L. (1981). in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* John Wiley & Sons Inc.
- Preiß A. (2014). *Identifizierung zyklischer Peptide als Dissoziatoren der Toxoplasma gondii Ferredoxin-Liponsäure Synthase Interaktion*. Masterarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Quan J. und Tian J. (2009). *Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways*. PLoS One 4(7): e6441.
- Ramakrishnan S., Docampo M. D., Macrae J. I., Pujol F. M., Brooks C. F., van Dooren G. G., Hiltunen J. K., Kastaniotis A. J., McConville M. J. und Striepen B. (2012). *Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite Toxoplasma gondii*. J Biol Chem 287(7): 4957-4971.
- Ramakrishnan S., Docampo M. D., MacRae J. I., Ralton J. E., Rupasinghe T., McConville M. J. und Striepen B. (2015). *The intracellular parasite Toxoplasma gondii depends on the synthesis of long chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell*. Mol Microbiol.
- Ramakrishnan S., Serricchio M., Striepen B. und Butikofer P. (2013). *Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans*. Prog Lipid Res 52(4): 488-512.
- Rebeil R. und Nicholson W. L. (2001). *The subunit structure and catalytic mechanism of the Bacillus subtilis DNA repair enzyme spore photoproduct lyase*. Proc Natl Acad Sci U S A 98(16): 9038-9043.
- Reese M. L., Zeiner G. M., Saeij J. P., Boothroyd J. C. und Boyle J. P. (2011). *Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in Toxoplasma virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A 108(23): 9625-9630.
- Robert Koch-Institut (2007). *Toxoplasmose: RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblatt für Ärzte*. Epid Bull 42: 390-394.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B. und Sahn H. (1993). *Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate*. Biochem J 295 ( Pt 2): 517-524.
- Rohrich R. C., Englert N., Troschke K., Reichenberg A., Hintz M., Seeber F., Balconi E., Aliverti A., Zanetti G., Kohler U., Pfeiffer M., Beck E., Jomaa H. und Wiesner J. (2005). *Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of Plasmodium falciparum*. FEBS Lett 579(28): 6433-6438.
- Rossel J. B., Wilson I. W. und Pogson B. J. (2002). *Global changes in gene expression in response to high light in Arabidopsis*. Plant Physiol 130(3): 1109-1120.
- Rugarabamu G., Marq J. B., Guerin A., Lebrun M. und Soldati-Favre D. (2015). *Distinct contribution of Toxoplasma gondii rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion*. Mol Microbiol.
- Sagan L. (1967). *On the origin of mitosing cells*. J Theor Biol 14(3): 255-274.
- Saito T., Nishi M., Lim M. I., Wu B., Maeda T., Hashimoto H., Takeuchi T., Roos D. S. und Asai T. (2008). *A Novel GDP-dependent Pyruvate Kinase Isozyme from Toxoplasma gondii Localizes to Both the Apicoplast and the Mitochondrion*. Journal of Biological Chemistry 283(20): 14041-14052.
- Sampson T. R. und Weiss D. S. (2014). *Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology*. Bioessays 36(1): 34-38.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-5467.
- Sartorello R., Budu A., Bagnaresi P., Fernandes C. A., Sato P. M., Bueno V. B., Fontes M. R., Oliveira P. L., Paiva-Silva G. O., Alves S. V., Netto L. E., Catalani L. H. und Garcia C.

- R. (2010). *In vivo uptake of a haem analogue Zn protoporphyrin IX by the human malaria parasite P. falciparum-infected red blood cells*. Cell Biol Int 34(8): 859-865.
- Sauret-Gueto S., Botella-Pavia P., Flores-Perez U., Martinez-Garcia J. F., San Roman C., Leon P., Boronat A. und Rodriguez-Concepcion M. (2006). *Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in Arabidopsis*. Plant Physiol 141(1): 75-84.
- Schwartzman J. D. und Pfefferkorn E. R. (1981). *Pyrimidine synthesis by intracellular Toxoplasma gondii*. J Parasitol 67(2): 150-158.
- Scott C. P., Abel-Santos E., Jones A. D. und Benkovic S. J. (2001). *Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries*. Chem Biol 8(8): 801-815.
- Scott C. P., Abel-Santos E., Wall M., Wahnnon D. C. und Benkovic S. J. (1999). *Production of cyclic peptides and proteins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(24): 13638-13643.
- Seeber F. (2002). *Eukaryotic genomes contain a [2Fe-2S] ferredoxin isoform with a conserved C-terminal sequence motif*. Trends Biochem Sci 27(11): 545-547.
- Seeber F., Aliverti A. und Zanetti G. (2005). *The plant-type ferredoxin-NADP+ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites*. Curr Pharm Des 11(24): 3159-3172.
- Seeber F., Feagin J. F. und Parsons M. (2014). *The Apicoplast and Mitochondrion of Toxoplasma gondii*. in Weiss L. M. und Kim K. *Toxoplasma gondii* Elsevier / Academic Press. 2: 577-611.
- Seeber F. und Soldati-Favre D. (2010). *Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa*. Int Rev Cell Mol Biol 281: 161-228.
- Seeber F. und Soldati D. (2007). *The Metabolic Functions of the Mitochondrion and the Apicoplast*. in Ajioka J. W. und Soldati D. *Toxoplasma - Molecular and Cellular Biology* Horizon Bioscience. 1: 409-435.
- Shaffer A. L., Wojnar W. und Nelson W. (1990). *Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by Thermus aquaticus DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction*. Anal Biochem 190(2): 292-296.
- Shen B., Brown K. M., Lee T. D. und Sibley L. D. (2014). *Efficient gene disruption in diverse strains of Toxoplasma gondii using CRISPR/CAS9*. MBio 5(3): e01114-01114.
- Shin M. und Arnon D. I. (1965). *Enzymic Mechanisms of Pyridine Nucleotide Reduction in Chloroplasts*. J Biol Chem 240: 1405-1411.
- Shin M. und Pietro A. S. (1968). *Complex formation of ferredoxin-NADP reductase with ferredoxin and with NADP*. Biochem Biophys Res Commun 33(1): 38-42.
- Shin M., Tagawa K. und Arnon D. I. (1963). *Crystallization of Ferredoxin-Tpn Reductase and Its Role in the Photosynthetic Apparatus of Chloroplasts*. Biochem Z 338: 84-96.
- Sidik S. M., Hackett C. G., Tran F., Westwood N. J. und Lourido S. (2014). *Efficient genome engineering of Toxoplasma gondii using CRISPR/Cas9*. PLoS One 9(6): e100450.
- Sidik S. M., Huet D., Ganesan S. M., Huynh M. H., Wang T., Nasamu A. S., Thiru P., Saeij J. P., Carruthers V. B., Niles J. C., Lorigo S., (2016). *A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes*. Cell 166 (6): 1423-1435.e12.
- Singh R., Singh S., Parihar P., Singh V. P. und Prasad S. M. (2015). *Retrograde signaling between plastid and nucleus: A review*. J Plant Physiol 181: 55-66.
- Singh V. K. und Ghosh I. (2013). *Methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids: kinetic modeling and in silico enzyme inhibitions in Plasmodium falciparum*. FEBS Lett 587(17): 2806-2817.
- Smith S., Witkowski A. und Joshi A. K. (2003). *Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase*. Prog Lipid Res 42(4): 289-317.
- Spalding M. D. und Prigge S. T. (2010). *Lipoic acid metabolism in microbial pathogens*. Microbiol Mol Biol Rev 74(2): 200-228.

- Starnes G. L., Coincon M., Sygusch J. und Sibley L. D. (2009). *Aldolase is essential for energy production and bridging adhesin-actin cytoskeletal interactions during parasite invasion of host cells*. Cell Host Microbe 5(4): 353-364.
- Stasi M., De Luca M. und Bucci C. (2015). *Two-hybrid-based systems: Powerful tools for investigation of membrane traffic machineries*. J Biotechnol 202: 105-117.
- Storm J. und Muller S. (2012). *Lipoic acid metabolism of Plasmodium--a suitable drug target*. Curr Pharm Des 18(24): 3480-3489.
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J. R. und Chory J. (2003). *Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX*. Nature 421(6918): 79-83.
- Striepen B. und Soldati D. (2007). *Genetic Manipulation of Toxoplasma gondii*. in Weiss L. M. und Kim K. *Toxoplasma gondii* Elsevier / Academic Press. 1: 391-418.
- Sugiyama N., Nakagami H., Mochida K., Daudi A., Tomita M., Shirasu K. und Ishihama Y. (2008). *Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis*. Mol Syst Biol 4: 193.
- Surolia N. und Surolia A. (2001). *Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of Plasmodium falciparum*. Nat Med 7(2): 167-173.
- Susek R. E., Ausubel F. M. und Chory J. (1993). *Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development*. Cell 74(5): 787-799.
- Sztajer H., Gamain B., Aumann K. D., Slomianny C., Becker K., Brigelius-Flohe R. und Flohe L. (2001). *The putative glutathione peroxidase gene of Plasmodium falciparum codes for a thioredoxin peroxidase*. J Biol Chem 276(10): 7397-7403.
- Takahashi S., Seki M., Ishida J., Satou M., Sakurai T., Narusaka M., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Akiyama K., Yamaguchi-Shinozaki K. und Shinozaki K. (2004). *Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray*. Plant Mol Biol 56(1): 29-55.
- Talabani H., Mergey T., Yera H., Delair E., Brezin A. P., Langsley G. und Dupouy-Camet J. (2010). *Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review*. Parasite 17(3): 177-182.
- Tanaka R. und Tanaka A. (2007). *Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants*. Annu Rev Plant Biol 58: 321-346.
- Tavassoli A. und Benkovic S. J. (2007). *Split-intein mediated circular ligation used in the synthesis of cyclic peptide libraries in E. coli*. Nat Protoc 2(5): 1126-1133.
- Thibodeau S. A., Fang R. und Joung J. K. (2004). *High-throughput beta-galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems*. Biotechniques 36(3): 410-415.
- Thomsen-Zieger N., Pandini V., Caprini G., Aliverti A., Cramer J., Selzer P. M., Zanetti G. und Seeber F. (2004). *A single in vivo-selected point mutation in the active center of Toxoplasma gondii ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase leads to an inactive enzyme with greatly enhanced affinity for ferredoxin*. FEBS Lett 576(3): 375-380.
- Thomsen-Zieger N., Schachtner J. und Seeber F. (2003). *Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid*. FEBS Lett 547(1-3): 80-86.
- Treeck M., Sanders J. L., Elias J. E. und Boothroyd J. C. (2011). *The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries*. Cell Host Microbe 10(4): 410-419.
- Tsien R. Y. (1998). *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem 67: 509-544.
- Urscher M., Przyborski J. M., Imoto M. und Deponte M. (2010). *Distinct subcellular localization in the cytosol and apicoplast, unexpected dimerization and inhibition of Plasmodium falciparum glyoxalases*. Mol Microbiol 76(1): 92-103.

- van Dooren G. G., Kennedy A. T. und McFadden G. I. (2012). *The Use and Abuse of Heme in Apicomplexan Parasites*. *Antioxidants & Redox Signaling* 17(4): 634-656.
- Vanagas L., Jeffers V., Bogado S. S., Dalmasso M. C., Sullivan W. J., Jr. und Angel S. O. (2012). *Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(10): 1189-1201.
- Vollmer M., Thomsen N., Wiek S. und Seeber F. (2001). *Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP+ reductase and ferredoxin*. *J Biol Chem* 276(8): 5483-5490.
- Voss I., Koelmann M., Wojtera J., Holtgreffe S., Kitzmann C., Backhausen J. E. und Scheibe R. (2008). *Knockout of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 133(3): 584-598.
- Wachter R. M., Elsliger M. A., Kallio K., Hanson G. T. und Remington S. J. (1998). *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. *Structure* 6(10): 1267-1277.
- Waller R. F., Keeling P. J., Donald R. G., Striepen B., Handman E., Lang-Unnasch N., Cowman A. F., Besra G. S., Roos D. S. und McFadden G. I. (1998). *Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12352-12357.
- Whipple F. W. (1998). *Genetic analysis of prokaryotic and eukaryotic DNA-binding proteins in Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 26(16): 3700-3706.
- Wiesner J. und Jomaa H. (2007). *Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target*. *Curr Drug Targets* 8(1): 3-13.
- Wiesner J. und Seeber F. (2005). *The plastid-derived organelle of protozoan human parasites as a target of established and emerging drugs*. *Expert Opin Ther Targets* 9(1): 23-44.
- Wilkinson C., McPhillie M. J., Zhou Y., Woods S., Afanador G. A., Rawson S., Khaliq F., Prigge S. T., Roberts C. W., Rice D. W., McLeod R., Fishwick C. W. und Muench S. P. (2014). *The benzimidazole based drugs show good activity against T. gondii but poor activity against its proposed enoyl reductase enzyme target*. *Bioorg Med Chem Lett* 24(3): 911-916.
- Wilson R. J. und Williamson D. H. (1997). *Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(1): 1-16.
- Wilson R. J., Williamson D. H. und Preiser P. (1994). *Malaria and other Apicomplexans: the plant connection*. *Infect Agents Dis* 3(1): 29-37.
- Woodson J. D., Perez-Ruiz J. M. und Chory J. (2011). *Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants*. *Curr Biol* 21(10): 897-903.
- Wu W., Herrera Z., Ebert D., Baska K., Cho S. H., DeRisi J. L. und Yeh E. (2015). *A chemical rescue screen identifies a Plasmodium falciparum apicoplast inhibitor targeting MEP isoprenoid precursor biosynthesis*. *Antimicrob Agents Chemother* 59(1): 356-364.
- Xiao H., El Bissati K., Verdier-Pinard P., Burd B., Zhang H., Kim K., Fiser A., Angeletti R. H. und Weiss L. M. (2010). *Post-translational modifications to Toxoplasma gondii alpha- and beta-tubulins include novel C-terminal methylation*. *J Proteome Res* 9(1): 359-372.
- Xiao Y., Savchenko T., Baidoo E. E., Chehab W. E., Hayden D. M., Tolstikov V., Corwin J. A., Kliebenstein D. J., Keasling J. D. und Dehesh K. (2012). *Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes*. *Cell* 149(7): 1525-1535.
- Xue B., Jeffers V., Sullivan W. J. und Uversky V. N. (2013). *Protein intrinsic disorder in the acetylome of intracellular and extracellular Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst* 9(4): 645-657.

- Yang Z., Guo G., Zhang M., Liu C. Y., Hu Q., Lam H., Cheng H., Xue Y., Li J. und Li N. (2013). *Stable isotope metabolic labeling-based quantitative phosphoproteomic analysis of Arabidopsis mutants reveals ethylene-regulated time-dependent phosphoproteins and putative substrates of constitutive triple response 1 kinase*. Mol Cell Proteomics 12(12): 3559-3582.
- Yao Z. K., Krai P. M., Merino E. F., Simpson M. E., Slebodnick C., Cassera M. B. und Carlier P. R. (2015). *Determination of the active stereoisomer of the MEP pathway-targeting antimalarial agent MMV008138, and initial structure-activity studies*. Bioorg Med Chem Lett 25(7): 1515-1519.
- Zanetti G., Binda C. und Aliverti A. (2006). *The [2Fe-2S] Ferredoxins*. Handbook of Metalloproteins: 1-11.
- Zanetti G. und Merati G. (1987). *Interaction between photosystem I and ferredoxin. Identification by chemical cross-linking of the polypeptide which binds ferredoxin*. Eur J Biochem 169(1): 143-146.
- Zhou K., Zou R., Stephanopoulos G. und Too H. P. (2012). *Metabolite profiling identified methylerythritol cyclodiphosphate efflux as a limiting step in microbial isoprenoid production*. PLoS One 7(11): e47513.
- Zhou L., Zhang K. und Wanner B. L. (2004). *Chromosomal expression of foreign and native genes from regulatable promoters in Escherichia coli*. Methods Mol Biol 267: 123-134.

## 7. Anhang

### 7.1 *T. gondii* Ferredoxin-Sequenzen

#### Genomische Ferredoxin-Sequenz

```

1      10      20      30      40      50      60
AAAACGGAGG ACCGCCTGGT AAAAGGGAAG AGAAAGCTCA GCACCAAGCG TTCTGCTTTT
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

70     80     90     100    110    120
CTCGGAAACT GTTTAGACAA GCGAAGTCTC TGAAACCTCA GCCGACTGGC ATAACGCGGA
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

130    140    150    160    170    180
GGAGAACAACT GTCCTTCGAT GCGAGACACT CAAAACCTTT CTGTCTGCTC TCGGCTGTGC
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

190    200    210    220    230    240
AGGGAGCCTT GCATGCGGCG ACCTCTGCCG AGGCAGATTA AGCGCAAAC T GATGTGTGG
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

250    260    270    280    290    300
ACTTCTGACC TTGCTCTCGA AAGGCGTTTC CTGTACTTTC AGTCTTTGGT TCTCGAAATC
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

310    320    330    340    350    360
TTGCGGGGCG CCCTGCTGGC GTCTCACTCG CTGGCCGCGG TTGCGCTGGG ATCGGTGCCT
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

370    380    390    400    410    420
TCACCTTCAC TTTGAAATTG CTTTTCCGC CGGTTCCGCT TTCCATACTT TCGTTTGGAA
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

430    440    450    460    470    480
GAACAGAGTT CGCGCCTCGC ATTCTGTGCG GGGATACCAT GAAGCGAGAC CTCGAAACGG
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

490    500    510    520    530    540
ACTGTCCTAT CGAGTTGTGA CTTTGCTTCA GGTGTCACTG CCGAGGACGA GGGTCGTCGG
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

550    560    570    580    590    600
GGGAAAAGCG TCTCGGTCAG GATTTACCTC TTGACGGTTT CGCTGACGCT CTTTGCTAC
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

610    620    630    640    650    660
GAGTTTTCCT ACGACAAGTA CCTGTCCTCG CGGTCGTCAC CTCCGCCGTA TTCGTTCGAG
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

670    680    690    700    710    720
GAAAACGGGA GCGCGGAGAA TTGCTCAGAG CCTCAAGACT GCATGTTTTT TCCTGAACGC
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

730    740    750    760    770    780
GGTGCATGTC TCTATCCGGG GAGTGGGGGC GACGCCTCAC ATGTGCAGCC GGGACAAGTT
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

790    800    810    820    830    840
CAACTCCACG ACGATTTCCA AGTCGTCCTC CTCGACGAGA GAGACTTTTT TATGTGACAG
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

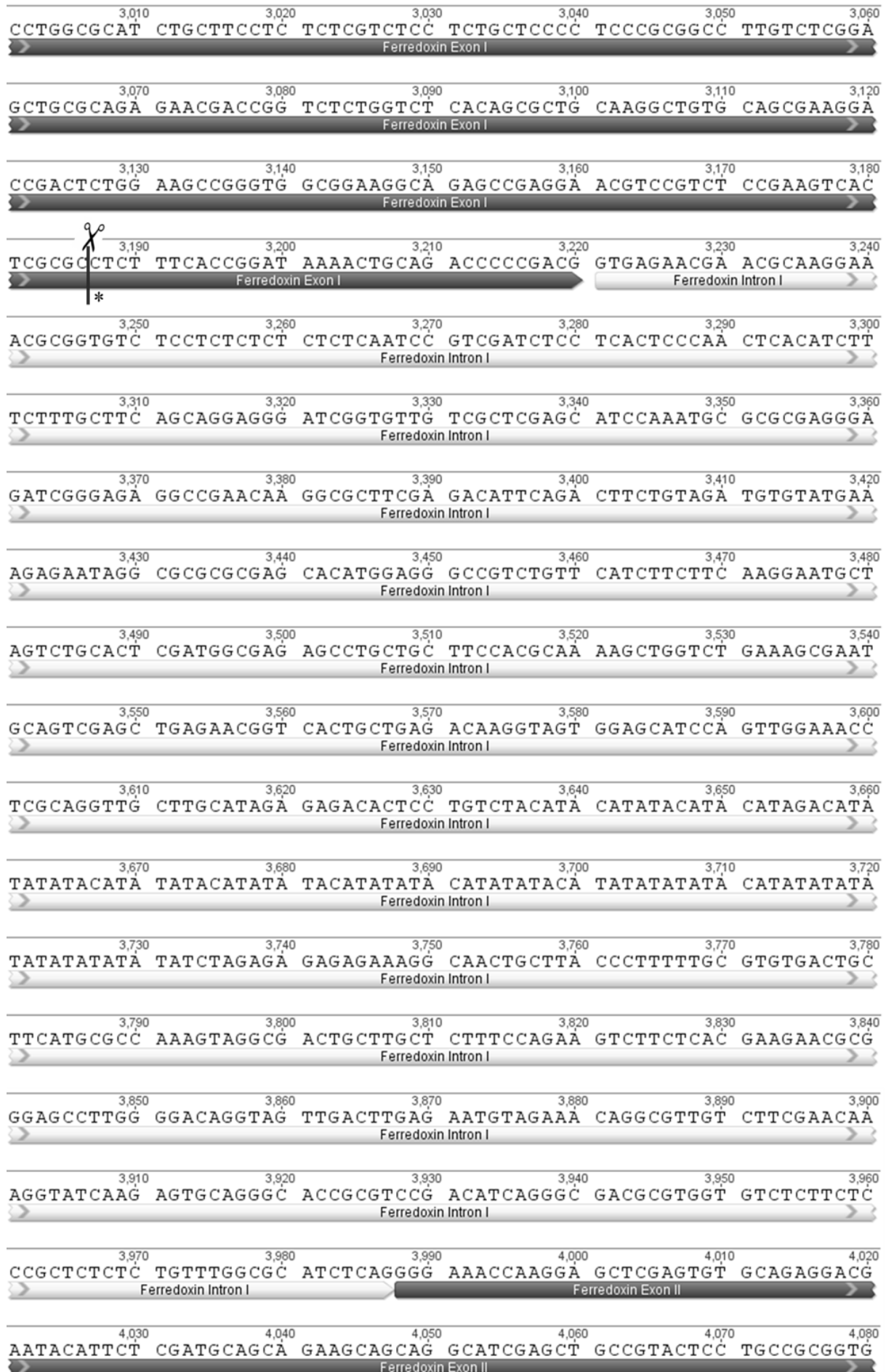
850    860    870    880    890    900
AAAATGTTTC TTGCCACTGG GGCTTTGCTT GCTTGTCTAC GTTCGGGGAT GTTTTTCTCT
      Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd

```

910	920	930	940	950	960
TTGAGTTGTTT	CGCTTCGCGT	TTCGCTCTTC	TATCTCGGT	TCGGAAGGT	TCTAGTTTCG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
970	980	990	1,000	1,010	1,020
TTTCTTGCC	AGAGGCCG	TCCCGATT	GAGTCTGCT	CTCTCTATC	GCGTTTGTG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
1,030	1,040	1,050	1,060	1,070	1,080
TTTTGCCTC	ACGTCGAGG	CTGTTTCTCT	GCTGTGTT	TCTTTGATTT	CCGGCGTCTG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - pi...					
1,090	1,100	1,110	1,120	1,130	1,140
GCGACAAAC	GCGCGAGTC	TGCGAAGCT	GACGGAGGT	CTCACTCGAG	AAAAAGGATG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,150	1,160	1,170	1,180	1,190	1,200
GCCCGCGCT	AGCGAGTCG	TCTCTGTAG	CTCCGAACG	CACGCAGAG	CTTCTTCTCG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,210	1,220	1,230	1,240	1,250	1,260
CGACAGACAG	CACTAAGTGG	ATATGTATAC	CGGAAAGGAT	GCAAATGAAC	ATCTACGTGA
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,270	1,280	1,290	1,300	1,310	1,320
CCAATAGAGA	CAGATAATCA	GATGTCGATA	GATTGACAGA	TAGGCATAGA	TCGATATATA
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,330	1,340	1,350	1,360	1,370	1,380
TAGATAGATA	TAGATAGATG	GATACTGATA	GATTGATGGA	TAGATGCAGA	GAGATGTAGA
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,390	1,400	1,410	1,420	1,430	1,440
TATAGATAGA	CAGAGAGACA	GATAGACACA	AATATATATA	TATATATAAA	TATTAAATAT
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,450	1,460	1,470	1,480	1,490	1,500
ATATGAGTTT	AGGGTGTCCG	CAGGCTCACT	TTGACGTGT	GGTGGATTT	CTCTTTCCCC
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,510	1,520	1,530	1,540	1,550	1,560
AGTTATTTTG	CGACCAGACA	AATGCCATGG	ATTGGCAACG	CGTTGCCCTG	CGTTTTCTTG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,570	1,580	1,590	1,600	1,610	1,620
CTGGATTTCAT	GAGCGACGTT	GACTGGATGG	ACTATCTCCA	CACAACAGAG	CACAAGGTCA
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,630	1,640	1,650	1,660	1,670	1,680
TAACTTTTTG	TGGTGGCGTG	TAAAGTAGGT	GAAGTCCTAA	CTAATCCACC	TATTGCGGTC
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,690	1,700	1,710	1,720	1,730	1,740
CGCACCTCG	ACCACTGAAA	AAAACGGGGA	GAAACTCCAG	GAAACACTGT	TGAAGACATG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,750	1,760	1,770	1,780	1,790	1,800
GCCTTCCTCG	TGACGAACAT	CCATGAACGC	TAGCATAGAT	AGAGATCAAC	CGCCCTGCGA
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,810	1,820	1,830	1,840	1,850	1,860
CGTATTCCGT	AGAAACAAA	AATTGGGCAG	GAGACTACCA	ACGTGCGTAT	CCTTGTACAG
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,870	1,880	1,890	1,900	1,910	1,920
GTTAAGATCT	GAGTTGTGCT	TTTCTCTCCC	TGCTAATGCG	ACCGACTGCC	GTTTATTTAT
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					

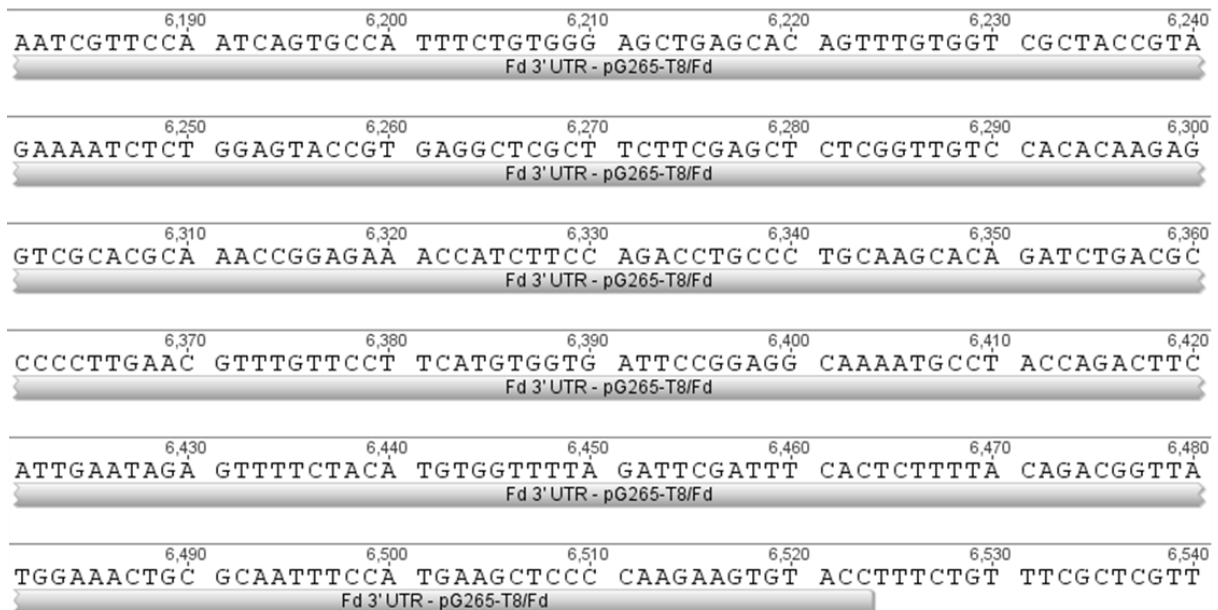


1,930	1,940	1,950	1,960	1,970	1,980
TTCATTTGAT CCATCACCAC TGTAATAGA CAGATGTCGG TATGTCTCTT CGTCGTGTGT					
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 5' UTR - piko-Fd					
1,990	2,000	2,010	2,020	2,030	2,040
GTCTCGTAAA GATGGCCTGC TGGCTGCGGA GACAGCACGG AGTTTGAGAA TGTGAGGGGT					
Fd 5' UTR - pG265-T8/Fd				als endogene Promoterregion verwen...	
Fd 5' UTR - piko-Fd					
2,050	2,060	2,070	2,080	2,090	2,100
TTGGCATCCG AGAACATGGA CGTCGACGAA GAGCGCGGAC GAGACGAATC ACCCGCGAAG					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,110	2,120	2,130	2,140	2,150	2,160
GATCAACAGA TCAAACAGAA GAAACTGTCT TTCGTTTGCG TGCTATCGTC CGTATGTGCG					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,170	2,180	2,190	2,200	2,210	2,220
TCCATGGTAT AAAGACTCAA GACTTGCATG ACGCCGTCGC CCGCGTCGAG AGAGGCGGAG					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,230	2,240	2,250	2,260	2,270	2,280
GAGAAACGCG ACGGCAGTCG CTTCAGCTGC CGGACTGGAC TCTGCAAAAG CATGCTTTCT					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,290	2,300	2,310	2,320	2,330	2,340
TCTTTCTTTT TTCTTCTTCC GTGAAACTC CTCTTTCTCG CTTGGCGACG CGGAATCGTC					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,350	2,360	2,370	2,380	2,390	2,400
TGGTGGACGT CGAGCTGAGA GGTATCCGCC GAGGGCTCTC CGCTCTGGAC GTTCTTCGGA					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,410	2,420	2,430	2,440	2,450	2,460
GCTCCTTCTG CGGCGAAAAA GCATGGTTCC CCGTAAGAGA CGTTCTCTGT CTGTCCACTG					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,470	2,480	2,490	2,500	2,510	2,520
TTGAAAGGTC GAAGACAACG AACGAAACAG AGACCAAAG GAGGAAGGCG ACCGTGGACG					
als endogene Promoterregion verwendete Sequenz					
2,530	2,540	2,550	2,560	2,570	2,580
ATGGCGGACG CCTCCCTGTT GCCAGGTGAG CCGGCAGTGG CGGGCGCGAT GAGCCGCGAG					
Ferredoxin Exon I					
2,590	2,600	2,610	2,620	2,630	2,640
GCTCTTTTTC CGCGCAGAAT GCCGGTATTT CCGAGCGGCG CATTTCTCTC GCCTCCACGT					
Ferredoxin Exon I					
2,650	2,660	2,670	2,680	2,690	2,700
TTTTCTCGAA TTCTCCTGGT CGTCTGTCTC TGTTTTTTTT CCTCGTCTCC TCTCGCCTTC					
Ferredoxin Exon I					
2,710	2,720	2,730	2,740	2,750	2,760
GTTTCTTCCC TATCCACTTG GAACAGCGCC TCGTCGGCGG CCTCCGCGTT GTCTGGCGCG					
Ferredoxin Exon I					
2,770	2,780	2,790	2,800	2,810	2,820
TCTTCCCCGA GTTCGTCTTG CTCCTTCGCT GCTTCGCCCT CACGCGAGTG CCGCCGCGCG					
Ferredoxin Exon I					
2,830	2,840	2,850	2,860	2,870	2,880
TCCTCGCTGC CACTGGGAGC GTCCACCAAC GCTCGCCCAG GTCGCCTCCG AGAACCGGAG					
Ferredoxin Exon I					
2,890	2,900	2,910	2,920	2,930	2,940
AGAAGCGCCA AGTTCCGGCT CCCTTCAGTC TCGGCCTTCC TGGGTCCTTC TGCTCTCTGT					
Ferredoxin Exon I					
2,950	2,960	2,970	2,980	2,990	3,000
CCGTCAAGCA CCGTCTCTGC GTCCAGCGCT GAAGCGACGC TTCCAACCTCT TGGCAGACAG					
Ferredoxin Exon I					



4,090	4,100	4,110	4,120	4,130	4,140
GCTCATGCAG	TACATGCGCA	GGTAAGAGCT	TCGGAGGGAA	ATGTTCTGTTT	CTCTGTAGGT
Ferredoxin Exon II		Ferredoxin Intron II			
4,150	4,160	4,170	4,180	4,190	4,200
TTTCGCGCGA	GTTGCGGCGC	CCCAGAGCGC	TTTCTCCACG	CATTCTGCTC	TTCTCCTGAC
Ferredoxin Intron II					
4,210	4,220	4,230	4,240	4,250	4,260
TCTGTGGCGC	GCGCCCTTCG	GTGTCTTGTC	TCGTTCTTCG	GACGTTCTGC	CAGTGTGTTT
Ferredoxin Intron II					
4,270	4,280	4,290	4,300	4,310	4,320
CGCAGTCGGC	TTCTCTCCCC	CGTATATCGC	GCGCGTCGAT	GCATGCACTC	GCCTCTCCTC
Ferredoxin Intron II					
4,330	4,340	4,350	4,360	4,370	4,380
GCTGCTGTCT	GCGTTCGCCG	GTGGCGCTGT	GGCTTAGGCA	AGCTGTTGGT	GGGTTCCGTC
Ferredoxin Intron II			Ferredoxin Exon III		
4,390	4,400	4,410	4,420	4,430	4,440
GACGGCAGCG	AGCAAGTTTA	CCTCGACGAC	GCCCAGCAGA	AGAAAGGCTA	CGTCTTGCTC
Ferredoxin Exon III					
4,450	4,460	4,470	4,480	4,490	4,500
TGCACAGCGT	ATCCGAAAGA	AGACTGCACA	ATTCTGACTC	ACCAGGAAGA	CCAGCTCCAC
Ferredoxin Exon III					
4,510	4,520	4,530	4,540	4,550	4,560
AGTGAAGGCG	GAGACGAGTG	ACCGCGCCTG	CTCTCGCAAG	CTGGAGGCGT	GTAGCGCTGG
Ferredoxin Exon III		Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd			
		Fd 3' UTR - piko-Fd			
4,570	4,580	4,590	4,600	4,610	4,620
TGGCTCTTCG	GGAGAGTCCC	TGTCGACTCC	ATTCGCCTCT	CGAATCTTCC	AAGTCATCCG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,630	4,640	4,650	4,660	4,670	4,680
TCCGCTGCAG	GTCGCTGTCT	CGCCGTTTCA	CCTCTCGGCA	GACAAAGCCG	CTCGCAGCTG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,690	4,700	4,710	4,720	4,730	4,740
GACGCGCAGG	TGGAGATGCT	GAAACGCAGG	TTGACGTCTC	GAGCGTGGAC	GCGGGGGAAG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,750	4,760	4,770	4,780	4,790	4,800
AGCTGCGAAG	AGAAACACAA	GCTCTGCGTC	GCGCCGAGGA	CGGCGAAACG	AGAGGACAAC
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,810	4,820	4,830	4,840	4,850	4,860
ATGCGGTTTCG	GAGACCGTTT	GGGGCATCCC	AGTTGAGACA	TTAAACCTGA	AACAGCAAGT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,870	4,880	4,890	4,900	4,910	4,920
GCAGCAAAGC	ACCAAGGAAA	CATGATGAGG	GGGTGGGGGG	CACAAAACGA	ACAGAAGTGA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,930	4,940	4,950	4,960	4,970	4,980
TCACAGAGAG	GCAAGAAAGA	AGAAACAGGA	AGAAGCAGCA	CAAGACAACG	ACTGTCAAGC
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
4,990	5,000	5,010	5,020	5,030	5,040
CCATCACAGA	GCAGAGCCGC	AACCGAGTTG	GCTGTGGCGT	AGCAGAGGCT	CACACTTTGA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,050	5,060	5,070	5,080	5,090	5,100
CGGCGAACCT	GGAAGTCAGC	AAAGCCTCCA	GTCCTGGAGA	TTTGTCTGGA	CGGAACAACG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					

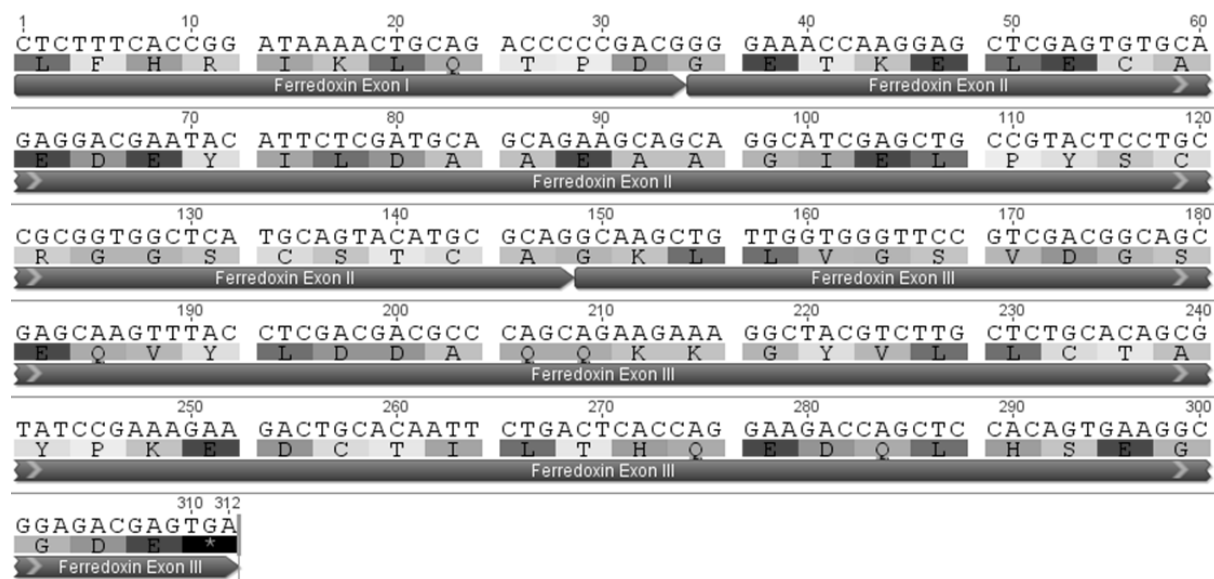
5,110	5,120	5,130	5,140	5,150	5,160
GTTTCTCGAG	CTGTTGCGAG	GCAGGAAAAG	ATGAGATCTG	CGGCTTGCGT	TCCGGAGTCA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,170	5,180	5,190	5,200	5,210	5,220
GCACAAAGAC	GTCCAGAGGG	AACATGTAGA	GGTCGAGAGA	CAGACAGTTC	AACGCTGTTT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,230	5,240	5,250	5,260	5,270	5,280
TCTGTACCTC	ACGCGATTCC	TGTTGCGTTT	GACATTTTCT	GGGGGGGAAA	TGTTGGAGAG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,290	5,300	5,310	5,320	5,330	5,340
AGACGCGCGA	CTCTCAAACA	GGAGTCTCTG	ACCGAGCTCG	AAATGAGAAA	AAGGAATCGA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,350	5,360	5,370	5,380	5,390	5,400
GTTTCCTTTA	ACTGCCGAGT	GGAGGTTTGG	CGTAGATACA	GCAGGAAATT	CACATAGTGG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,410	5,420	5,430	5,440	5,450	5,460
AAATCAACAA	TCCTGAAGAG	CTTGAATGCG	AATGGTAGTC	AGCCGAGCGG	AGGGGAAGTT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,470	5,480	5,490	5,500	5,510	5,520
TCTCGCAGGC	TGGCCCTGCA	TCTCTCTTCT	GCAAGGCAGA	GGGCTCGTGT	GTCGTCGCAG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,530	5,540	5,550	5,560	5,570	5,580
GCCTCTTTCT	TGGAAATCAT	AACCTTTTGA	AGTTCTTGTG	TCTCCGTCGT	TGTTCCGCCG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,590	5,600	5,610	5,620	5,630	5,640
GGGTCTGTTG	TCAGCATGTC	CTTGGCTGCT	CCGCTTTCCA	GCTCCTGGAA	GGTCCATCGA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,650	5,660	5,670	5,680	5,690	5,700
AGAAAAACGT	GTAAAGGTGG	TTTTCTGTTG	TCATGGAGAC	TGGCCGTTTG	TCTATTCAGT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,710	5,720	5,730	5,740	5,750	5,760
CGTTTCTTTG	GAAAAAAAC	GTAATTTTTT	TGGTTCTCTC	GAGGCCTCGA	AGGAGGCCTT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,770	5,780	5,790	5,800	5,810	5,820
CGCCTTGCTT	CGAGGCGTTT	GCTCAGTCAA	TCAGTTCCAC	CGTTGAACGA	AGAAATACAG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,830	5,840	5,850	5,860	5,870	5,880
TTTAAAAGTA	TGTCAGGAAC	TTACAGGAA	GAAGGCTACG	CACTTTGTAT	CAATTTTCTC
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,890	5,900	5,910	5,920	5,930	5,940
AGTAAATAT	GCAGCCTCAG	GATACGACAA	GCCGACGTCG	AGGTGACAAC	CCTCACCTGT
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
5,950	5,960	5,970	5,980	5,990	6,000
TTAGTCGGTT	GGTCACCGAT	TTGCTCTCTG	TATCGATTTC	ACTACTTGTC	TCCAGACATA
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
6,010	6,020	6,030	6,040	6,050	6,060
GTCAGATCAC	TCTCTGTGCC	TCTTGCTATT	TGCCTGCATA	GAGAGACATA	ACTCTCTATG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
6,070	6,080	6,090	6,100	6,110	6,120
CCTCTTGCA	TCTTGCTTTT	TGAGCAGTTT	AATGCGGACA	GTATCCACCG	GACGCCCTGC
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					
6,130	6,140	6,150	6,160	6,170	6,180
TGAGGACAAC	GGTGTCTAT	CATGGGTGGA	CCTTGCCGAG	TTGAATTCTG	CAGAGTCTCG
Fd 3' UTR - pG265-T8/Fd					
Fd 3' UTR - piko-Fd					



**Abb. 32: Ferredoxin Sequenz von *T. gondii* eines GT1-Stammes (Typ I-Stamm; Chromosom X)**

\*voraussichtliche Abspaltung der Apicoplasten Targetingsequenz (Quelle: Toxo DB)

### Ferredoxin cDNA Sequenz



**Abb. 33: Ferredoxin cDNA Sequenz von *T. gondii***

Dargestellt ist die cDNA Sequenz ab der voraussichtlichen Abspaltung der Apicoplasten Targetingsequenz. Je nach verwendetem Plasmid befindet sich N-terminal ein Startcodon (pET28b-TgFd) oder eine Fusion mit P22 (pNF1 bzw. pNF2 Konstrukte, siehe Tab. 5).

## 7.2 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 23 Geräteliste

Gerät	Hersteller/Firma, Ort
<i>Accu-jet<sup>®</sup> pro</i> Pipettierhelfer	Brand GmbH, Wertheim, D
Agarosegelelektrophoresekammern <i>Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT System</i> und <i>Sub-Cell<sup>®</sup> GT System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<i>Amaxa<sup>®</sup> Nucleofector<sup>®</sup> II Device</i>	Lonza Cologne GmbH, Köln, D
Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen, D
Elektroporationssystem <i>Gene Pulser Xcell<sup>™</sup></i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Geldokumentationssystem	SERVA, Heidelberg, D
Heizblock <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Kühlinkubatoren Serie KB und Serie KT	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Magnetrührer/Heizblock <i>RCT basic IKAMAG<sup>®</sup></i>	IKA Werke, Staufen, D
Mikroplattenlesegerät <i>Infinite<sup>®</sup> M200 PRO</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikroskope: AxioImager.Z1/ApoTome und AxioObserver.Z1	Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Mikrowelle <i>intellrowave</i>	LG Electronics, Seoul, Korea
Mikrozentrifuge himac CT15RE	Hitachi Koki, Tokyo, Japan
Minizentrifuge Rotilabo <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Multikanalpipetten <i>Transferpette<sup>®</sup>-8/12</i>	Brand GmbH, Wertheim, D
pH Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, D
Pipetten <i>Pipetman Classic<sup>™</sup></i> 0,2-2 µL/ 1-10 µL/ 2-20 µL/ 50-200 µL/ 200-1000 µL	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Plattformschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, D
<i>Power PAC 3000</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Präzisionswaage TE1502S	Sartorius AG, Göttingen, D
Rollrad <i>Stuart Rotator SB2</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Schüttelinkubator <i>Innova<sup>®</sup> 40</i>	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Sicherheitswerkbank <i>Safety Cabinet Series ASW-UP IV-1906</i>	Bleymehl GmbH, Inden, D
<i>SpeedVac<sup>™</sup></i> Concentrator	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D
Spektrophotometer <i>NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D
Spektrophotometer tragbar <i>Ultrospec 10</i>	GE Healthcare, München, D
Sterilbank <i>Labgard Class II</i>	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
Thermozykler <i>DNA Engine<sup>®</sup></i>	Bio-Rad, München, D
Thermozykler <i>TPersonal</i>	Biometra GmbH, Göttingen, D
Transilluminator 470 nm	BioView Ltd., Billerica, USA

Gerät	Hersteller/Firma, Ort
Ultraschallbad (Sonorex RK100H)	BANDELIN electronic GmbH&Co.KG, Berlin, D
Vakuumpumpe <i>Mini-Vac power</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad GFL 1002	GFL mbH, Burgwedel, D
Zentrifuge Heraeus Sepatech Omnifuge 2.0. RS	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich LabTec, Tuttlingen, D

**Tab. 24 Chemikalienliste**

Chemikalie	Hersteller/Firma, Ort
3-AT	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Ammoniummolybdat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Anhydrotetracyclin (ATc)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Bactotrypton (Trypton/Pepton)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, D
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Calciumfluorid	Fluka, Seelze, D
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, D
Chloroform ≥ 99.8%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
D(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Dapi	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
D-Glucose (U- <sup>13</sup> C6, 99%)	Euriso-Top GmbH, Saarbrücken, D
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
DMEM <i>high glucose</i> (4.5 g/l) mit stabilem Glutamin	GE Healthcare, München, D
DMEM <i>High Glucose</i> , mit: L-Glutamine, ohne: Phenolrot, Natriumpyruvat, Vitamine (Puder)	Biomol GmbH, Hamburg, D
DMEM Vitamin Mix ohne Thiamin 25X (Puder)	Biomol GmbH, Hamburg, D

Chemikalie	Hersteller/Firma, Ort
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Essigsäure 96%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol $\geq 99,5\%$ , reinst oder vergällt mit 1% Methyl ethylketon	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
FKS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Fluoromount™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
GelGreen™	Biotium, Hayward, CA, USA
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D
Gentamycin	Gerbu Biotechnik, Heidelberg, D
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
IPTG	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Isopropanol, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kristallviolett	neoLab GmbH, Berlin, D
Kupfersulfat	Fluka, Seelze, D
L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Manganchlorid	Fluka, Seelze, D
Mannitol	Gerbu Biotechnik, Heidelberg, D
Methanol, reinst oder GC Ultra grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
MOPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat, 100 mM	Merck KGaA, Darmstadt, D
ONPG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D



Chemikalie	Hersteller/Firma, Ort
Penicillin/Streptomycin (100 Units/100 µg pro mL; 100x)	Biochrom AG, Berlin, D
Polymyxin B	Fluka, Seelze, D
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Salzsäure 32%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
scyllo-Inositol	Abcam plc., Cambridge, UK
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Spectinomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tergitol NP-9	Fluka, Seelze, D
Tetracyclin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Timentin	Glaxo Smith Kline, London, UK
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton X-100	Fluka, Seelze, D
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom AG, Berlin, D
TTC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
X-Gal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Zinkchlorid	Fluka, Seelze, D

**Tab. 25 Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Firma, Ort
Achtloch-Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, D
C-Chip <i>Disposable Hemocytometer</i>	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, D
Deckgläschen (10 mm Ø)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Einmalküvetten Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Elektroporationsküvetten LE 1 mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Impfösen	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Mikrotiterplatten 12/24/96-Lochplatten	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Objektträger 76x26 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Petrischalen 94x16 mm, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Petrischalen quadratisch 120x120 mm, steril	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, D
Serologische Pipetten	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Spritzen <i>Omnifix</i> ® 5 ml/ 10 ml/ 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Firma, Ort
Spritzenfilter <i>Minisart</i> 0,2 µm/ 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen, D
Transfektionsküvetten Mirus Bio Ingenio® 0,2 cm	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
Vakuumfilter „ <i>rapid</i> “-Filtermax PES-Membran 0,22 µm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen T25/T75/T150	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen <i>µ-Dish</i> , 35 mm, mit Grid	Ibidi GmbH, München, D
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

### 7.3 Oligonukleotide

**Tab. 26 Oligonukleotide eingesetzt zur Klonierung (1-37) und zur analytischen PCR bzw. Sequenzierung (34-80)**

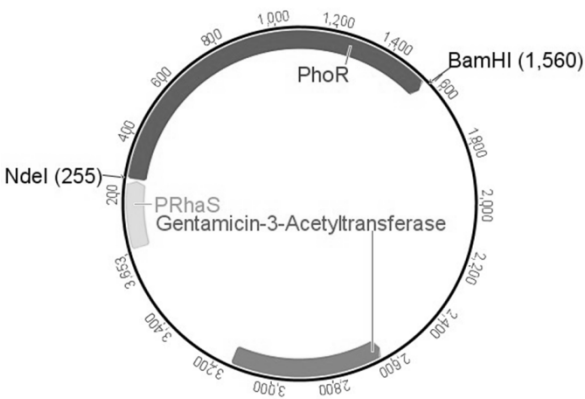
Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1	5'-TgFd_CPEC	GTGAAGCTTGTGAACCCTACGATATCAAGCTCGAGACTCTCT TTCACCGGATAA
2	3'-TgFd_CPEC	CATGTTGTATACTCCTTCTTAGGTACCCCGGGAGCTCACTCG TCTCCGCCTTC
3	5'-TgFNR_CPEC	CTTGTGAACCCTACGATATCAAGGTCGACGGATCCGCCTCCTA CCCTTATGAT
4	3'-TgFNR_CPEC	GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTAGTACACCTCAAC GTGCC
5	5'-TgLipA_CPEC	GTGAACCCTACGATATCAAGGTCGACGGATCCCAGGGCCGGT CTTGCGGG
6	3'-TgLipA_CPEC	CAAACATGAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGTCACGCCTCTT TCTCGTTTACTTG
7	5'-FNR-BamBsmBI	GACCGTCTCGGATCCGCGACCCCGACCGACCAAAC
8	3'-FNR-BamBsmBI	GGCGTCTCGGATCCCTAGTACACCTCAACGTGCC
9	5'-FNR-SpeBsmBI	GGCGTCTCACTAGTGCGACCCCGACCGACCAAAC
10	3'-FNR-SpeBsmBI	GGCGTCTCACTAGTCTAGTACACCTCAACGTGCC
11	5'-PTac_CPEC	CCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTGACAATTAATCATC GG
12	3'-PTac_CPEC	GTCCAAGCTGAATTCTTTTGCTTTTACCCTGGAAGAAATACT CATATGCTATGGTCCTTGTTGGTG
13	5'-P22_CPEC	CACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCATATGAGTATTT CTTCCAGGGTAAAAAG
14	piko1x-SbfISwaI-FW	CATGGCCTGCAGGATTTAAATG

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
15	piko1x-SbfISwaI-BW	GATCCATTTAAATCCTGCAGGC
16	piko1x-PmeI-FW	GATCTGTTTAAACA
17	piko1x-PmeI-BW	CTAGTGTTTAAACA
18	5'-piko3UTR_CPEC	GCTCATCTCCGAGGAGGACCTGAGATCTGTTTGAGCGCCTGC TCTCGCAAGC
19	3'-piko3UTR_CPEC	CTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGTTTCCTGCGACGACA CACGAG
20	5'-piko5UTR_CPEC	CCGGCCGCCATGGCCTGCAGGATTTCCGGCGTCTGGCGACA AACG
21	3'-piko5UTR_CPEC	GTCGAGGGGGGGCCCGGATCCATTTCCGTGCTGTCTCCGCAG C
22	5'-pikoFd_CPEC	CTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTGAATTCCTAGGG ATATCATGGCGGACGCCTCCCTG
23	3'-pikoFd_CPEC	GAGATGAGCTTCTGCTCACTGCCACTGCCCTCGTCTCCGCCT TCACT
24	5'-endPUPRT_SLIC	GTGGCGCGCCCGGTCCGCCCCGAGTTTGAGAATGTGAGGGG
25	3'-FdUPRT_SLIC	GGGACGTCGTACGGGTACCCCTCGTCTCCGCCTTCACT
26	5'-FdMyc_SLIC	AGTTATAGAATTCCGACAAAATGGCGGACGCCTCCCTG
27	3'-FdMyc_SLIC	TATGCTATACGAAGTTATTATCAAACAGATCTCAGGTCTCTCC
28	5'-Tub8_SLIC	CTGGCTGCGGAGACAGCACGGGCCCCCCTCGACGGTA
29	3'-Tub8_SLIC	AACAGGGAGGCGTCCGCCATTTTGTGCGAATTCTATAACTTC GTATAATG
30	5'-5UTR_SLIC	ATAGGGCGAATTGGGTACCGGGAGGACCGCCTGGTAAAAG
31	3'-5UTR_SLIC	GATACCGTCGAGGGGGGGCCCGTGCTGTCTCCGCAGCC
32	5'-3UTR_SLIC	TCAGGCGCGCCGGCGCCGATCCGCGCCTGCTCTCGCAA
33	3'-3UTR_SLIC	AGCTGGAGCTCCCCGGGGATGGTACACTTCTTGGGGAGC
34	5'-DCUTRNeoI_SLIC	TTTGCCGACCAGACAAATGCCATGGATTGGCAACGCGTTGC
35	3'-DCendP_SLIC	TGTATGCTATACGAAGTTATCGTCCACGGTCGCCTTCC
36	5'-DCloxP_SLIC	GAGGAAGGCGACCGTGGACGATAACTTCGTATAGCATACATT ATAC
37	3'-DCIntBstBI_SLIC	ACTCTTGATACCTTTGTTTGAAGACAACGCCTGTTTCTAC
38	2'-YFP-BW	AACTTGTGGCCGTTTACGTC
39	2-5UTR-FW	GACTGCCGTTTATTTATTTTCATTG
40	3'-3UTR-BW	TACTCCAGAGATTTTCTACGGTA
41	3'-DiCre-5UTR	TCTATCTGTCTGTCTGTCTATCTAT
42	3'-DiCre-genomic	GAAATCAGAAAGGAAACCGAAAAAG
43	3'-DiCre-YFP	GGATCTTGAAGTTCACCTTGATG
44	3-HX-FW	CGTTCTGATTGTTGAGGACATC

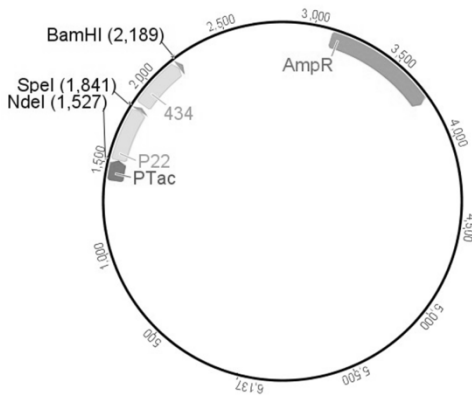
Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
45	434-BW	GCTGCTCGATCGACTGCTGGG
46	434-FW	CCCAGCAGTCGATCGAGCAGC
47	5'-3UTR-Seq	CAAGTTCTTGTGTCTCCGTC
48	5'-DiCre-5UTR	TGACAGATAGGCATAGATCGATATA
49	5'-pG265-bb	CCAGTCACGACGTTGTAAAA
50	5'-Prom152-FW	GGACAAATCCGCCGGGAGCG
51	DiCre-loxP-BW	TTTGTGCGAATTCTATAACTTCGTA
52	P1	GGAATCAATGCCTGAGTG
53	P2	ACTTAACGGCTGACATGG
54	P3	ACGAGTATCGAGATGGCA
55	P4	GGCATCAACAGCACATTC
56	pAH152-Prom FW	GGCAGGACGCCCCGCCATAAA
57	pAH-THCPn-BW	TGCTTTGTGCATACAGCCCCTCG
58	pAH-THCPn-FW	GCGGCCGCGCTTTTTACCAG
59	piko-1x1/2-BW	GGTTGCGTCGTCAGGGACGG
60	piko-1x1/2-FW	CGATCGGTGCGGGCCTCTTC
61	piko-1xumPmeI-BW	TGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
62	piko-1xumPmeI-FW	TGGGCAGAGCCGTTGTGCAG
63	piko-35UTR-BW	CAGCGGACGGATGACTTGGAAGATT
64	piko-endPFd-BW	GAGGAGTTTTACGGAAGAAGAAAA
65	piko-endPFd-FW,	CTGTCTGTCCACTGTTGAAAG
66	piko-FdExI2-BW	GCAGTTTTATCCGGTGAAAGAG
67	piko-FdExI-BW	CAGGAGAATTCGAGAAAAACGT
68	piko-FdExI-FW	TGCTCCTTCGCTGCTTCGCC
69	piko-FdExII-BW	GGCAGGAGTACGGCAGCTCG
70	piko-FdExIII-FW	TTGCTCTGCACAGCGTATCCGAAAG
71	piko-FdMycII-FW	GGCAGTGGCAGTGAGCAGAA
72	piko-Tub8-BW	TCCAACCAGGATCACCAACCG
73	PRhaS-FW	TCGCCGTGTTGACGACATCA
74	Seq-3UTR-BW	GAGACAGCGACCTGCAGCGG
75	Seq-IntronFd-FW	CGGGAGCCTTGGGGACAGGT
76	Seq-RH-BW	GCTGGAAAGCGGAGCAGCCAA
77	Seq-RH-FW	TCGCTTCGCGTTTCGCTCTTCT
78	Seq-TgFd-FW	CCACAGTGAAGGCGGAGACGA
79	Seq-TgFNR-BW	GCAGCTGCTTGCCATGGTG
80	Seq-TgLipA-BW	CGTGCACGTGTCACCCAGCA

7.4 Plasmidkarten

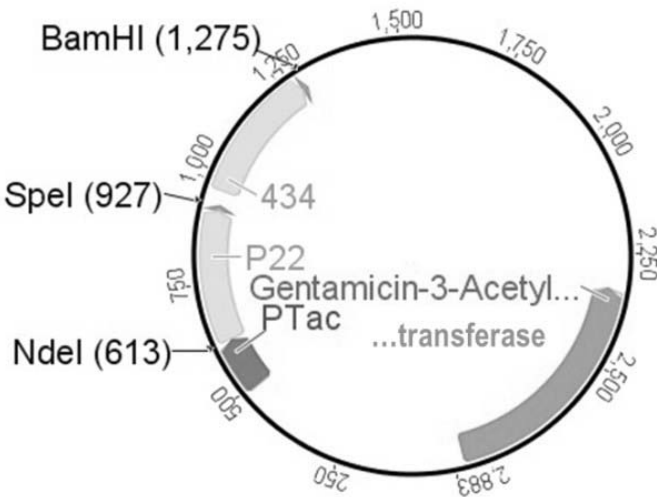
pAH152 (3653 bp)



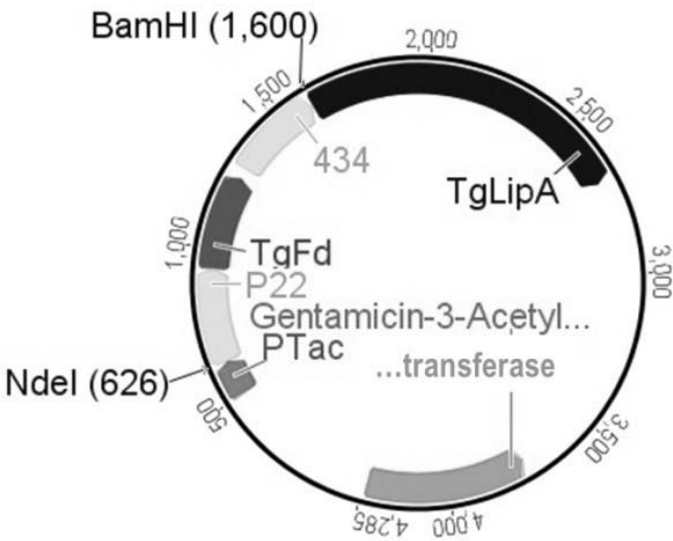
pTHCP14 (6137 bp)



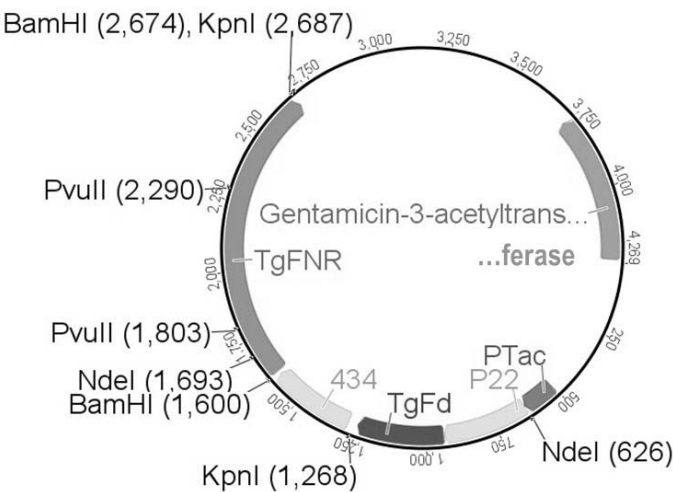
pNF2 (2883 bp)



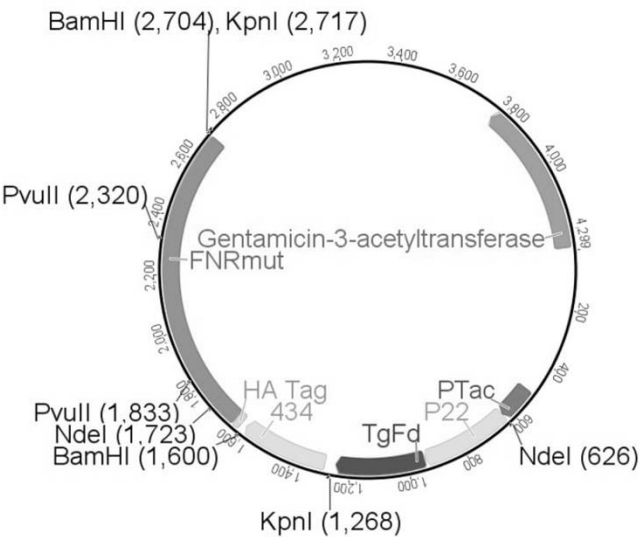
pNF2-Fd-LipA (4285 bp)



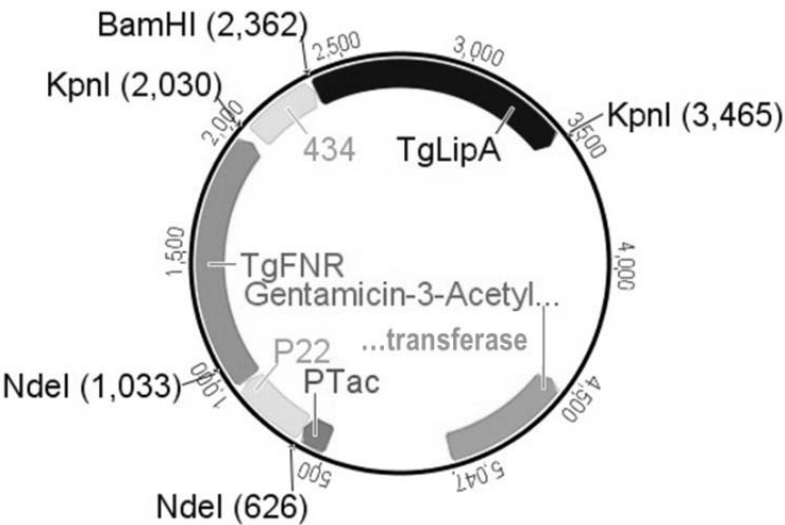
**pNF2-Fd-FNR (4269 bp)**



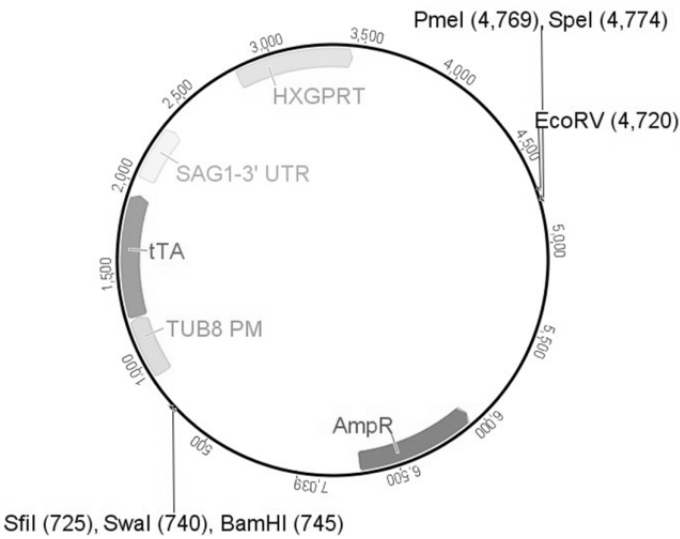
**pNF2-Fd-FNRmut (4299 bp)**



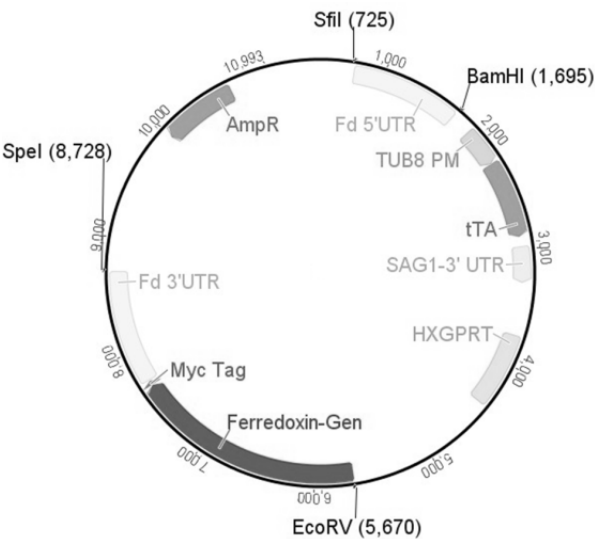
**pNF2-FNR-LipA (5047 bp)**



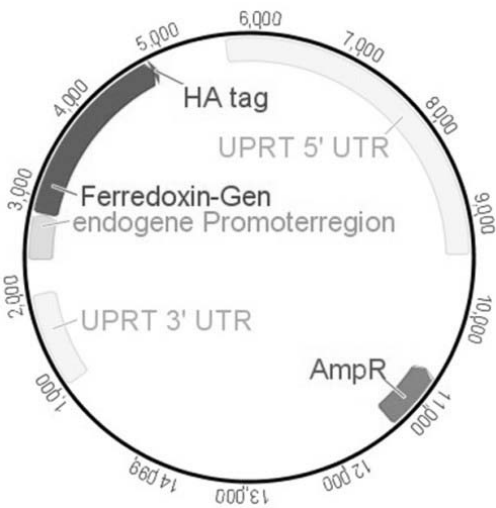
piko-1x (7039 bp)



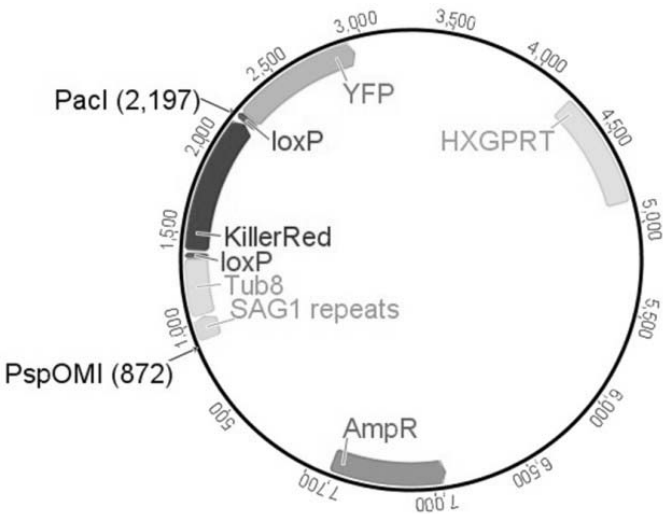
piko-Fd (10993 bp)



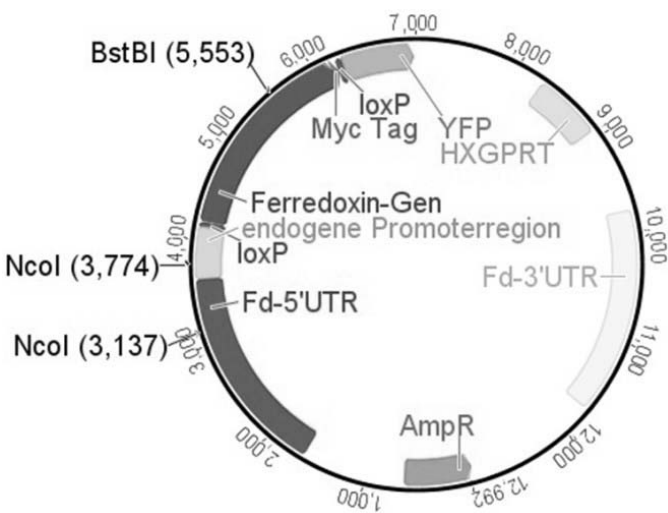
pGRA-UPRT-Fd (14099 bp)



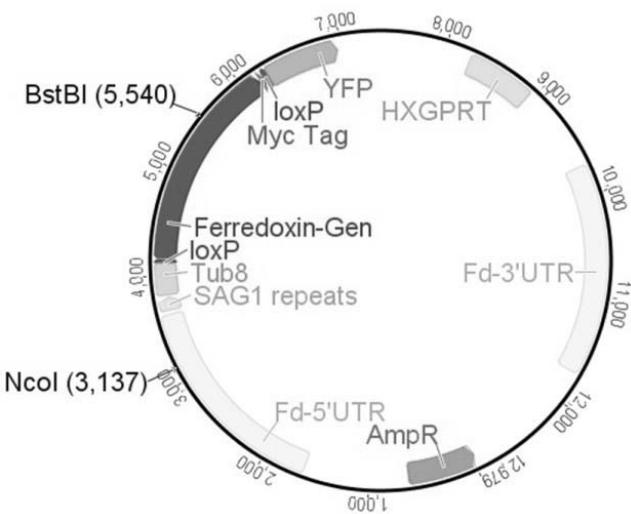
**pG265 (7700 bp)**



**pG265-Fd (12992 bp)**



**pG265-T8Fd (12979 bp)**





## 7.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Nora Frohnecke, die Kenntnisnahme über die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung.

Gemäß § 7 Absatz 3 der Promotionsordnung erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung des Ferredoxin Redoxsystems von *Toxoplasma gondii*“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens gewesen ist oder als ungenügend beurteilt wurde.

Unter meiner Anleitung und Betreuung hat Adriana Preiß ihre Masterarbeit „Identifizierung zyklischer Peptide als Dissoziatoren der *Toxoplasma gondii* Ferredoxin-Liponsäure Synthase Interaktion“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Seeber (FG 16, Robert Koch-Institut) angefertigt.

---

Datum, Ort

---

Unterschrift

## 7.6 Publikation und Tagungsbeiträge

### Publikationen

- Frohnecke N., Klein S. und Seeber F. (2015). Protein-protein interaction studies provide evidence for electron transfer from ferredoxin to lipoic acid synthase in *Toxoplasma gondii*. FEBS Lett 589(1): 31-36.
- Ufermann C. M., Müller F., Frohnecke N., Laue M., Seeber F. (2016). *Toxoplasma gondii* plaque assays revisited: Improvements for ultrastructural and quantitative evaluation of lytic parasite growth. Exp Parasitol pii: S0014-4894(16)30393-9.

### Tagungsbeiträge

#### I) Poster

- Nationales Symposium für Zoonosenforschung (Berlin, Deutschland, 2012)  
 “Characterization of the protein-protein interaction of ferredoxin and lipoate synthase from *Toxoplasma gondii*”
64. DGHM Jahrestagung (Hamburg, Deutschland, 2012)  
 „Protein-protein interaction studies of ferredoxin and lipoate synthase from *Toxoplasma gondii*“
- 12th International Congress on Toxoplasmosis (Oxford, Großbritannien, 2013)  
 “Functional characterization of the ferredoxin redox system of *Toxoplasma gondii* by interaction screens and gene knock-out”

#### II) Vorträge

- Statusworkshop der Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger der DGHM (Göttingen, Deutschland, 2014)  
 “Functional characterization of the ferredoxin redox system of *Toxoplasma gondii* by gene knock-out”
- 11th International Coccidiosis Conference (Dresden, Deutschland, 2014)  
 “Functional characterization of the ferredoxin redox system of *Toxoplasma gondii* by gene knock-down and knock-out studies”